Untersuchungen über die Auflösung von Zellulosen und Zellwänden durch Pilze

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

genehmigt

von der philosophischen Fakultät der
Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Berlin.

Von

HERMANN OTTO

aus Berlin.

Mit einer Doppeltafel.

Tag der Promotion: 4. August 1916.

Berlin

Gebrüder Borntraeger

1916

Untersuchungen über die Auflösung von Zellulosen und Zellwänden durch Pilze

---

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

genehmigt

von der philosophischen Fakultät der
Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Berlin.

Von

HERMANN OTTO
aus Berlin.

Mit einer Doppeltafel.

Tag der Promotion: 4. August 1916.

ACAD.
LUGD.BAT.
BIBL.

Berlin
Gebrüder Borntraeger
1916

Referenten:

Professor Dr. G. Haberlandt,
Professor Dr. A. Engler.

Die Arbeit erscheint zugleich im I. Band 2. Heft der Beiträge zur Allgemeinen Botanik.
Verlag von Gebrüder Borntraeger in Berlin und Leipzig.
1916.

Historische Einleitung.

Bei dem Interesse, welches die Frage der Zellulosezerstörung in der Natur für verschiedene Wissensgebiete besitzt, haben sich naturgemäß bisher viele Forscher an der Bearbeitung und Diskussion dieses Problems beteiligt. Dabei ist in manchen Punkten Klarheit erzielt worden, für die Mykologie jedoch ist die Frage nicht als geklärt anzusehen: hier stehen vielmehr noch immer eine größere Zahl widersprechender Meinungen einander gegenüber.

Schon in den 60er Jahren des vorigen Jahrhunderts[1]) war von verschiedenen Forschern, wie J. Kühn, de Bary, Tulasne, beobachtet worden, daß gewisse Pilzhyphen in pflanzlichen Geweben wachsen und dabei Zellwände durchbohren, ohne daß die betreffenden Autoren eine nähere Erklärung dafür suchten. Später zeigte Hartig (1878)[2]) in seinen „Untersuchungen über die Zersetzungserscheinungen des Holzes", daß an pilzkranken Bäumen alle möglichen Membranen ganz oder teilweise verschwunden waren. Auch er begnügte sich mit einer morphologischen Schilderung der Veränderungen.

Die physiologische Seite unserer Frage hat zuerst Nägeli[3])

1) J. Kühn, Die Krankheiten der Kulturgewächse, ihre Ursachen und ihre Verhütung. Berlin 1859. (Brandpilze.) — A. de Bary, Recherches sur le développement de quelques champignons parasites. Annales des Sc. nat., Sér. 4, Vol. 20, 1863. *(Peronospora.)* — L. R. Tulasne, Memoire sur uredinées. Ann. d. Sc. nat., Sér. 4, Vol. 2, 1861—65.

2) Hartig, Zersetzungserscheinungen d. Hölzer. Berlin 1878.

3) Nägeli, Ernährung d. nied. Pilze durch Kohlenstoff- und Stickstoffverbindungen. Sitzungsber. d. k. bayer. Akad., math. Kl., X, 1880, S. 277.

berührt. Dieser Forscher stellte 1880 die grundlegenden ernährungsphysiologischen Versuche mit verschiedenen C- und N-Verbindungen als Nährstoffen für Pilze an. Er hielt es damals für ausgeschlossen, daß Zellulose von den Pilzen als C-Quelle ausgenutzt werden könne; denn, sagte er, „selbstverständlich können solche Verbindungen, die in Wasser bei gewöhnlicher Temperatur unlöslich oder schwerlöslich sind, nicht ernähren".

Sechs Jahre später behauptete de Bary[1]), daß er durch *Peziza sclerotium (Botrytis vulgaris)* Zelluloselösung habe feststellen können. Tatsächlich handelte es sich jedoch bei diesem Befund nur um Auflösung von Stoffen der Mittellamellen, welche die älteren Anatomen ja nicht von Zellulose schieden.

Analoge Verhältnisse fand dann Marshall Ward (1888)[2]) bei einer *Botrytis*-Art, die auf *Lilium* parasitisch vorkam, Müller-Thurgau (1888)[3]) bei *Botrytis*, welche die Edelfäule der Trauben verursacht, ferner Kean (1890)[4]) bei *Rhizopus nigricans* und Behrens (1893)[5]) bei der *Botrytis (Sclerotinia)*, welche er als Erzeuger des Dachbrandes erkannte. Da diese Autoren ihre Befunde als „Zelluloselösung" bezeichnet hatten, war es interessant, daß Bourquelot (1893)[6]) und Pfeffer (1895)[7]) fanden, daß *Aspergillus niger* und *Penicillium glaucum* unter ihren Versuchsbedingungen dazu unfähig waren. 1894—95 erschienen die Untersuchungen von M. Miyoshi[8]), in dessen Versuchen Pilzhyphen die verschiedensten Membranen und Häute unter der Voraussetzung durchbohrten, daß darunter kräftige Nährlösungen sich befanden, welche die Hyphen chemotropisch reizten. Da neben verschiedenen organischen Häuten auch Metallblättchen durchbohrt wurden, lag der Schluß

---

1) A. de Bary, Über Sclerotinien und *Sclerotinia*-Krankheiten. Bot. Ztg., 1886, Bd. 44.

2) H. M. Ward, A lily-disease. Annals of botany, 1888, Vol. 2, No. 7, p. 319 bis 382.

3) Müller-Thurgau, Edelfäule der Trauben. Landw. Jahrb., Bd. 17, 1888, S. 83.

4) Kean, A. L., On the nature of certain plant diseases. Bot. Gaz., Vol. 15, 1890.

5) Behrens, J., Der Dachbrand. Zeitschr. f. Pflanzenkrankheiten, Bd. 3, 1893, S. 82.

6) Bourquelot, Les ferments solubles de l'aspergillus niger. Bulletin de la Soc. Mycolog. d. France, Vol. 9 (1893), p. 230—238, Vol. 10 (1894), Vol. 11 (1895).

7) W. Pfeffer, Über Elektion organischer Nährstoffe. Jahrb. f. wiss. Bot., 1895, Bd. 28, H. 2, S. 205.

8) M. Miyoshi, Über Chemotropismus der Pilze. Bot. Ztg., 1894, I. Abt., S. 22 ff.

nahe, daß das vorher mehrfach beobachtete Eindringen von parasitischen Pilzen durch die unverletzte Haut der Wirtpflanze ganz analog auf rein mechanischem Wege stattfände. Immerhin blieb es nicht ausgeschlossen, daß zur Erleichterung des Eindringens die Membranen mitunter durch Sekrete des Pilzes erweicht würden.

In den Jahren 1897 und 98 teilte Behrens[1]) in seinen Untersuchungen über den „Wurzelschimmel" und die „Obstfäule" zum ersten Male mit, daß Zellulose in Gestalt von Fließpapier als Nährstoff für *Botrytis vulgaris* dienen könne. Er fand eine Gewichtsabnahme von ca. 0,3 g, d. w. $^1/_{10}$ vom Trockengewicht der Zellulose. Diese Zahlenangaben führten später zur Anfechtung von Behrens' Schlüssen: Schellenberg[2]) führte diese relativ geringe Abnahme auf alleinige Ausnutzung von Verunreinigungen oder Hemizellulose-ähnlichen Umwandlungsprodukten der echten Zellulose zurück.

Mit dem angeblichen „Zellulose-Enzym", das Newcombe (1899)[3]) in der Takadiastase *(Aspergillus oryzae)* fand, ließen sich nur Hemizellulosen in Lösung bringen, ebenso mit den aus *Penicillium glaucum* (Grüß, 1900), *Ustilago* (Grüß, 1902)[4]) und *Aspergillus oryzae* (E. Schulze, 1902) erhaltenen Enzymen. Darum haben diese Untersuchungen für unser Problem geringere Bedeutung.

Inzwischen waren mehrere Holzpilze untersucht worden, aus denen Czapek (1899)[5]) seine „Hadromase" isolierte, die die Zellulose aus der Holzfaser freizumachen imstande war. Zellulase konnte in den Pilzen anfänglich nicht gefunden werden, sie wurde aber später (1901) von Kohnstamm[6]) aus leider nicht ganz reiner *Merulius*-Kultur gewonnen.

---

1) J. Behrens, Unters. üb. d. Wurzelschimmel. Zentralbl. f. Bakt., 1897, S. 585 ff. — Derselbe, Beiträge z. Kenntn. d. Obstfäule. Zentralbl. f. Bakt., 1898, S. 514 ff.

2) H. C. Schellenberg, Unters. üb. d. Verhalten einiger Pilze gegen Hemizellulosen. Flora, 1908, Bd. 98, H. 3, S. 257.

3) F. Newcombe, Cellulose-Enzymes. Ann. of Bot., 1899, Vol. 13, S. 49. Bot. Zentralbl., 1898, Bd. 73, S. 105.

4) J. Grüß, Biol. Erscheinungen bei d. Kultivierung von *Ustilago Maydis*. Ber. d. Deutsch. Bot. Ges., 1902, Bd. 30, S. 212 u. a.

5) Czapek, Über die sogenannte Ligninreaktion des Holzes. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Bd. 27, S. 141 u. a.

6) Kohnstamm, Zelluloseferment in *Merulius*. Beih. z. bot. Zentralbl., Bd. 10, 1901, S. 90 ff.

1902 und 1903 teilte Behrens[1]) in einer Arbeit über Pilze, welche bei der Tauröste des Hanfes auftreten, mit, daß *Botrytis* u. a. auch die Verdickungsschichten der Faser auflöse, wozu *Mucor stolonifer* und *Penicillium glaucum* unfähig seien, welch letzteres hingegen die Pektinstoffe als Nährquelle ausnützte.

1903—04 veröffentlichte C. van Iterson jun.[2]) Untersuchungen über Zellulosezersetzung durch aerobe Mikroorganismen. Er hat hauptsächlich denitrifizierende Bakterien studiert und als geeignete Zersetzer erkannt. Im Anschluß daran hat er auch mit einigen Hyphomyceten experimentiert, und sie zum Teil auf Fließpapier zur Entwicklung bringen können. Doch auch seine Resultate sind bezweifelt worden. Es mußte dagegen bemerkt werden, erstens daß das zur Nährlösung verwendete Leitungswasser zahlreiche organische Stoffe enthält, welche den bescheidenen Fadenpilzen schon eine nicht unbeträchtliche Entwicklung gestatten konnten. Ferner, daß die geringe Gewichtsabnahme (im günstigsten Falle 0,1 g = 14 %, sonst 9 % und 4 % vom Trockengewicht des Papiers), gerade so wie bei dem oben angeführten Einwand Schellenbergs gegen Behrens, sich auf Verunreinigungen resp. Hemizellulosen zurückführen ließe.

Zugunsten der Annahme, daß viele weitverbreitete parasitische Pilze offenbar kein Zelluloselösungsvermögen besitzen, konnten die Befunde der anatomisch-physiologischen Untersuchung mehrerer Pilzgallen durch H. v. Guttenberg[3]) (1905) ausgelegt werden. Einmal deuten die äußerst zarten, nadelartigen Perforationsfortsätze, welche die kräftigen Hyphen aussenden (besonders auch im Hinblick auf die Miyoshischen Befunde), auf eine rein mechanische Durchbohrung der Wände hin. Zweitens wäre aber auch das Abwehrmittel, welches die lebenden Zellen der Wirtpflanze anwenden, indem sie die eindringende Hyphe mit einer Zelluloseschеide umgeben, wenig wirksam, falls der Pilz tatsächlich ein zelluloselösendes Enzym ausschiede.

Im folgenden Jahre (1906) erschienen die Untersuchungen von

---

1) Behrens, Taurotte von Flachs und Hanf. Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 10, 1903, S. 524.

2) C. van Iterson jun., Zersetzung von Zellulose durch aerobe Mikroorganismen. Verslagen d. K. Akad. v. Wetensch., 1903, T. 9, p. 807 resp. 820. Zentralbl. f. Bakt., Bd. 11, Abt. II, Nr. 23, 1904. — C. F. Koning, La Connaissance de la vie des champignons humicoles. Arch. néerland., 1904, 2. Sér., p. 34.

3) H. v. Guttenberg, Physiolog. Anatomie der Pilzgallen. Leipzig 1905.

Appel und Schikorra[1]) über die Fusarien, die für die Geschichte unserer Frage Beachtung verdienen (obwohl sie viele Autoren vernachlässigen). Während fast alle untersuchten Formen die Zellulose nicht ausnutzten, obschon sie durch Milchsäure und Peptongehalt der Nährlösung zu guter Entwicklung gelangt waren, vermochte eine Spezies, *Fusarium vasinfectum*, beinahe die Hälfte des verwendeten Fließpapieres in lösliche Form zu überführen. Auf diese Zahl hin gab selbst Schellenberg, welcher bisher die allerschärfste Kritik übte, die Lösung „echter Zellulose" zu; soviel Substanz konnte kaum Verunreinigung sein.

Sehen wir uns jedoch das Ausgangsmaterial Schikorras genauer an: er verwendete Fließpapierschnitzel, die vor dem Versuch bei ca. 100° C getrocknet waren. Nun braucht nur das Papier noch geringe Reste von Säure aus dem Reinigungsprozeß enthalten zu haben, so kann durch deren katalytische Wirkung, wie Hans Hofmann gezeigt hat, die Zellulosefaser sehr leicht in chemisch weniger resistente Hydrozellulose verwandelt worden sein[2]), die nach einigen Autoren mit den leicht löslichen Hemizellulosen nahe verwandt sein soll. Dies scheint auch tatsächlich der Fall gewesen zu sein, denn das Papier war nach ausdrücklichen Angaben „morsch". So spricht auch dies dafür, daß hier infolge von Hydrozellulosebildung eine Täuschung nicht ausgeschlossen war, die aber erst jetzt nach den inzwischen erfolgten Fortschritten der Zellulosechemie erkannt werden konnte.

Im Jahre 1906 teilten Buller und Bourquelot (bekanntlich zwei der besten Enzymkenner) mit, daß sie aus Holzpilzen *(Polyporus)* weder Hadromase noch Zellulase, wohl aber Pektinase hätten isolieren können.

Fröhlich[3]) bezeichnete 1908 in seiner Arbeit über N-Bindung das Zelluloselösungsvermögen der Hyphomyceten für unerwiesen, aber möglicherweise vorhanden: Jute und Nesselfaser (die übrigens nicht als reine Zellulose zu gelten haben) wurden nach seinen Angaben im Hängetropfen von Mycel umsponnen. Korrosionen der Membran konnten von ihm jedoch nicht beobachtet werden.

Am eingehendsten beschäftigte sich mit unserer Frage

1) Appel und Schikorra, Beitr. z. Kenntnis d. Fusarien. Arb. d. k. biol. Anst. f. Land- u. Forstw., 1906, Bd. V, H. 4, S. 155—188.

2) Scheurer, Bull. Mulhouse, 55, 364. (1888.)

3) H. Fröhlich, Stickstoffbindung durch einige Hyphomyceten. Jahrb. f. wiss. Bot., Bd. 45, 1908, S. 256.

Schellenberg (1908)[1]). Er brachte Flocken von zahlreichen (16) Fadenpilzen aus Reinkultur auf dünne Schnitte und beobachtete unter dem Mikroskop die etwaige Auflösung der verschiedensten Membranen. Dabei lenkte er als erster die Aufmerksamkeit auf die chemische Wertung der Membranstoffe und kam zu dem Ergebnis, daß die Pilze gegen Hemizellulosen in bezug auf das Lösungsvermögen spezialisiert sind. Die bisherige „Zytase" erklärt er infolgedessen als eine Gruppe mehrerer Enzyme und benennt nach der Herkunft der von ihnen gelösten Hemizellulosen vorläufig vier neue Zytasen, die auch von der Zellulase (deren Existenz in Bakterien nicht zu bezweifeln ist) verschieden sind. Diese letztere konnte er jedoch, trotz aller Versuche, in keinem seiner 16 Pilze nachweisen; sowohl die echte Zellulose der Flachsfaser, als auch die der Baumwolle wurde in keinem Falle gelöst. Im Anschluß an seine Befunde unterwirft Schellenberg auch einen Teil der älteren Arbeiten einer scharfen Kritik und spricht ihnen, wie schon oben erwähnt, jede Beweiskraft ab. Trotzdem ermunterte er dazu, auch die Auflösung der echten Zellulose durch Pilze weiter zu prüfen, da das Verhalten der Holzpilze in der Natur und das der oben erwähnten *Fusarium*-Spezies sowie der *Bulgaria* das Vorhandensein von Zellulase bei Pilzen dennoch möglich, wenn nicht sogar wahrscheinlich macht.

Darauf untersuchte Hagem 1908—10 die als Boden- und Humuspilze äußerst wichtigen Mucorineen[2]) auf ihre Ernährungsphysiologie hin. Er stellte auch einige Versuche mit Zellulose an und verwendete diese dabei in Form von Fließpapier. Er fand aber alle seine Pilze unfähig, echte Zellulose zu lösen.

Hiermit glaubte er sich in Widerspruch zu Kean[3]) zu setzen, was jedoch bei genauer Prüfung sich als nicht zutreffend erweist; denn dieser spricht zwar von Zelluloselösung, hat aber in Wahrheit nur die Stoffe der Mittellamelle zur Lösung gebracht.

In neuester Zeit nahm sich Hans Pringsheim[4]) der Frage der Zellulosezerstörung an. Einmal suchte er sie „in Beziehung

1) Schellenberg, a. a. O., S. (3).

2) Hagem, Norweg. Mucorineen I u. II. Videnskabs-Selskabets Skrifter. Christiania 1908 u. 1910.

3) Kean, a. a. O., S. (2).

4) H. Pringsheim, Die Beziehungen der Zellulosezersetzung zum Stickstoffhaushalt in der Natur. Mitt. d. D. Landw. Ges., 1912. — Derselbe, Über den fermentativen Abbau der Zellulose. H. S. Zeitschr. f. physiolog. Chemie, Bd. 78, S. 266

zum Stickstoffhaushalt in der Natur" zu bringen und dann bemühte er sich die „Zelluloseferment"-Frage weiter zu klären.

Pringsheim arbeitete hauptsächlich mit Bakterienenzymen. Daneben isolierte er aber auch Pilzsporen aus der Luft und brachte sie zum Keimen auf Fließpapier; er fand jedoch, daß sie dieses nur im beschränkten Maße angreifen.

„Ihr Wachstum auf dem Papier in Abwesenheit anderer Quellen dürfte auf die geringen Verunreinigungen mit organischen Substanzen zurückzuführen sein, die dem Papier durch Waschen mit Wasser nicht zu entziehen sind, und die den so anspruchslosen Pilzen genügen."

Diese Ergebnisse trugen also zur Klärung unserer Frage (bezügl. der Fadenpilze) nicht bei, forderten höchstens auf, die Itersonschen Angaben mit Vorsicht hinzunehmen.

Glücklicher war Pringsheim bei seinen Versuchen mit den typischen Holzpilzen *Merulius* und *Polyporus*. Diese wurden als Mycelflocken auf Fließpapier geimpft und vermochten die Zellulose auszunützen. Leider hat Pringsheim mit diesen Pilzen nicht in Reinkulturen arbeiten können, da *Merulius* sich bisher überhaupt noch nicht völlig frei von Bakterien hat erhalten lassen.

Diese Komplikation macht eine genaue experimentelle Prüfung unserer Frage für die wichtigsten Holzpilze *(Merulius)* zur Unmöglichkeit.

Obwohl es demnach nicht einwandfrei erwiesen ist, sind heute wohl die meisten Forscher der Ansicht, daß die auf dem in Zersetzung begriffenen Holz typisch vorkommenden Formen auch ohne „Metabiose" mit Bakterien echte Zellulose lösen und deren Spaltungsprodukte zu ihrem eigenen Aufbau verwenden können.

Aus diesem Grunde habe ich auch nach einigen Versuchen von der Verwendung der Holzpilze abgesehen.

Den in dieser Übersicht zitierten Autoren galt in der Regel als Kriterium der Zelluloseauflösung bei ihren Versuchen: Gedeihen der Pilze auf dem bezüglichen Zellulosesubstrat als einziger Kohlenstoffquelle oder Gewichtsabnahme der Substrate. Den Korrosionserscheinungen an der Faser bezw. den Zellwänden wurde geringere Aufmerksamkeit gewidmet. De Bary, Hartig, Marshall Ward, Behrens, Schellenberg u. a. beschrieben Bilder, in denen die Mittellamellen der untersuchten Zellmembranen durch Enzyme aufgelöst wurden.

Auflösungserscheinungen, die an den sekundären Verdickungsschichten bewirkt waren, haben Behrens, Iterson, Schellenberg, Omelianski u. a. beobachtet.

Neuerdings beschrieb Haberlandt[1]) ausführlich zwei Typen der Auflösung resp. Korrosion von verholzten Membranen der Libriformfasern des Birkenholzes durch Bakterien resp. Verdauungsenzyme im Verdauungskanal des Schafes.

Beim ersten Typus traten an den Zellwänden überaus häufig grubige Vertiefungen, Querkanäle und linsenförmige Hohlräume auf; die stark verholzten Mittellamellen sowie die angrenzenden Membranschichten erwiesen sich am widerstandsfähigsten. Es werden also bei diesem Typus zirkumskripte Wandpartien in toto aufgelöst. Die Menge der „Inkrusten" in den verholzten Zellwänden ist nicht groß genug, um diese vor den Angriffen der Verdauungsenzyme bezw. der Bakterien zu schützen. Der zweite Korrosionstypus kennzeichnet sich durch das Auftreten einer zarten Längs- oder Schrägstreifung der Membran, woraus von Haberlandt geschlossen wird, daß zwischen den resistenteren Lamellen oder Fibrillen der verholzten Zellwand eine weniger resistente Kittsubstanz (Hemizellulosen, Pentosane) von den Verdauungssäften ganz oder teilweise aufgelöst wurde. Beiderlei Korrosionstypen wurden auch von mir immer wieder beobachtet. —

Die in der Literatur über unseren Gegenstand verbreiteten Unklarheiten und widersprechenden Ansichten rühren hauptsächlich davon her, daß bisher nur höchst ungenügende ernährungsphysiologische Versuche vorliegen, die sich einerseits auf zu wenig Pilzformen beschränken und andererseits bei der Auswahl der als Substrat gewählten Zellulose nicht genug Kritik und Mannigfaltigkeit walten lassen.

Auf Herrn Professor Beneckes Rat unternahm ich es darum, durch eine möglichst große Zahl eingehender Experimente neue Beiträge zur Klärung des Problems zu erbringen, ob tatsächlich die im Humus und auf faulenden Pflanzenteilen häufigen Fadenpilze an der Zerstörung der echten Zellulose beteiligt seien oder nicht.

1) Haberlandt u. Zuntz, Über die Verdaulichkeit der Zellwände des Holzes. Sitzungsber. d. K. pr. Akad. d. Wiss., 1915, XLI, S. 704 ff.

I. Chemische Charakteristik der Substrate.

Die Abgrenzung des Begriffes „Zellulose“ ist in der Literatur bisher sehr ungenau, und es herrscht über sie unter den Botanikern und Chemikern leider keine Einigkeit. Darum müssen wir uns zunächst klar werden, was hier als „echte Zellulose“ zu gelten hat, und wie wir diese von verwandten Stoffen zu trennen haben, welche häufig mit demselben Wort benannt wurden und zum Teil noch werden.

In verschiedenem Sinne ist das Wort „Zellulose“ von Schleiden, Fremy, F. Schulze, Payen, Mohl, Nägeli und vielen älteren Autoren gebraucht worden. Die einen bezeichnen damit einen Gattungsbegriff für eine größere Zahl isomerer, einheitlicher chemischer Verbindungen, andere stellen sich darunter eine bestimmte chemische Verbindung vor, die aber mehrere Modifikationen besitzen soll; wieder andere brauchen es im Sinne von „Zellhaut“ oder „Zellwand“.

Zu weitgehender Anerkennung gelangte die durch die chemischen Untersuchungen Payens begründete Ansicht, daß alle Zellwände der Pflanzen nur aus einer bestimmten (mit Stärke isomeren) Substanz von der Formel $C_6H_{10}O_5$ beständen. Bald aber erkannte man, daß viele Membranen, wie Holz, Kork in mikrochemischen Reaktionen ein abweichendes Verhalten zeigten. Man erklärte dieses Verhalten durch eingelagerte (inkrustierende) Stoffe bedingt, weil man durch gewisse Behandlung auch aus einigen jener Membranen „Zellulose“ isolieren konnte, welche die charakteristische Blaufärbung mit Jod und Schwefelsäure gab (Gmelin u. H. v. Mohl). Da aus dieser bei hydrolytischer Spaltung, welche immer nur mittels konzentrierterer Säuren möglich war, stets die gleiche Monose: Traubenzucker entstand, glaubte man jahrzehntelang nur an die Existenz einer einzigen Zellulose. Diese, so meinte man, bildet in allen Zellmembranen die Grundlage.

Bei genauer Prüfung der verschiedensten Zellwände konnte es jedoch nicht verborgen bleiben, daß in ihrem Aufbau doch eine größere Mannigfaltigkeit waltet.

Während Fremy und Schleiden die Möglichkeit der Existenz vieler, etwa isomerer Zellulosen erörtert hatten, ohne daß ihre Spekulationen Anhänger fanden, zeigten die Züricher Chemiker E. Schulze und seine Schüler durch exakte Untersuchungen, daß die Membranen mehrerer Samen aus Stoffen bestehen, welche sich

schon durch verdünnte Säuren in Lösung bringen ließen. Die chemische Untersuchung der hierbei entstandenen Abbauprodukte ergab, abweichend von denen der widerstandsfähigeren Membranen, eine Reihe anderer Monosen als Bausteine, wie l- und d-Galaktose, d-Mannose, d-Fruktose.

Da diese Membranstoffe, wie Reiß zeigte, auch beim Keimen der betreffenden Samen gelöst werden, um als Baustoffe für die jungen Pflanzen zu dienen, erhielten sie den Namen Reservezellulosen.

Mit weiterschreitender Forschung fand man solche leicht löslichen Membranstoffe jedoch auch in typischen Stützzellmembranen.

Neben Holzgummi (Xylan) und einem Teil der Pektinstoffe gehören hierher viele Membranstoffe der Kryptogamen, wie Gelose, Lichenin u. a. Wegen der Ähnlichkeiten in ihrem Verhalten und in ihren Abbauprodukten stellte man dann diese letzteren mit den Reserve-Zellulosen zusammen, als „Hemizellulosen" den echten (resistenteren) Zellulosen gegenüber.

Wenn auch die Abgrenzung der Hemizellulosen praktisch mitunter größere Schwierigkeiten macht, so genügen doch im allgemeinen noch heute folgende Reaktionen sie zu erkennen:

1. Sie lassen sich schon durch verdünnte Mineralsäuren in Lösung bringen (hydrolytisch spalten). Diese Eigenschaft teilen sie mit dem nächst Zellulose häufigsten Kohlehydrat der Pflanzen, der Stärke (s. Schulze u. a.).
2. Sie lassen sich alle durch Glyzerin bei 300° C in Lösung bringen (s. van Wisselingh u. a.).
3. Sie geben als hydrolytische Spaltungsprodukte nicht ausschließlich Dextrose, sondern daneben oder nur Galaktose, Mannose, Fruktose, Arabinose, Xylose und andere Pentosen (s. Gilson).

Solche natürliche Hemizellulosen kamen für meine Untersuchungen nur nebenher in Betracht. Über ihre Auflösung durch Pilzenzyme liegt eine größere Zahl von Beobachtungen von Schellenberg vor.

Nachdem so eine Reihe von Membrankohlehydraten als besondere Gruppe abgetrennt war, blieb noch die Chemie der Stoffe zu klären, welche die typischen Stützzellmembranen der Phanerogamen aufbauen. Es war zu untersuchen, ob die verbleibenden widerstandsfähigen Zellulosen mehrere einheitliche chemische

Substanzen seien oder ob sie alle eine resp. mehrere bestimmte Verbindungen als Grundlage hätten.

Lange Zeit hielt man an der Ansicht Payens fest, daß in allen diesen resistenten natürlichen Zellulosen ein bestimmtes Kohlehydrat die übereinstimmende Grundlage bilde, neben dem dann als sogenannte Inkrusten eine Reihe anderer schlecht definierter Stoffe rein physikalisch eingelagert seien.

Um eine einwandfreie Einteilung der natürlichen Zellulosen geben zu können, mußte man selbstverständlich die Natur dieser Inkrusten genauer zu erforschen suchen. Dies ist vielfach geschehen. Czapek[1]), Kroemer u. v. a. zählen eine große Zahl solcher isolierten Einlagerungen auf, jedoch sind viele von diesen komplizierten Verbindungen noch sehr hypothetisch.

Ebenso schwierig wie die Untersuchung dieser Stoffe und ebenso wichtig für ihre natürliche Systematik ist auch die Erforschung der Bindung dieser „Nichtzellulosen" mit der „Kohlehydratgrundlage". Es ist aber der alte Streit noch immer nicht entschieden, ob wir in den zusammengesetzten Zellulosen mechanische Gemenge, chemische Verbindungen oder etwa Adsorptionsverbindungen vor uns haben. Da die endgültige Entscheidung dieser Frage noch nicht abzusehen ist, teilt man heute bekanntlich fast allgemein die natürlichen Zellulosen nach dem Charakter der sie durchsetzenden Fremdstoffe (Nichtzellulosen) ein.

Cross und Bevan geben hiernach folgende Einteilung:

1. Verholzte Zellulosen (Ligno-Z.). Sie haben in der Natur die weiteste Verbreitung. Hierher gehören die Membranen der Hölzer, der Jutefaser.

2. Pekto- und Mucozellulosen. Sie liegen vor in den Fasern von Hanf, Flachs, Ramie, Baumwolle.

3. Cuto- und Adipozellulosen. Diese treten auf im Kork, in den Epidermen. (Daß bei den Stoffen dieser dritten Gruppe tatsächlich eine Kohlehydratgrundlage vorhanden sei, ist nicht die Ansicht aller Forscher.)

In der Natur finden sich zwischen diesen Gruppen aber auch Übergänge (s. Schwalbe). So kann z. B. die Baumwollfaser sowohl zu Gruppe 2. als auch zu 3. gezählt werden.

1) Czapek, Biochemie, II. Aufl. 1. B. 1913. 21. Kap.: Das Zellhautgerüst der Pflanzen. Die reiche Literatur über diesen Gegenstand ist hier eingehend berücksichtigt.

Aus der Reihe dieser zusammengesetzten Zellulosen lassen sich nun mittels zahlreicher technischer und biologischer Methoden die erwähnten Beimengungen (Inkrusten) entfernen.

Die älteren Autoren glaubten nun vielfach (s. a. a. O.), daß die bei allen diesen Prozessen aus dem Rohmaterial (d. h. den natürlichen Membranen) abgeschiedene Zellulose immer ein und dasselbe chemische Individuum darstelle. Diese Ansicht fand durch die Veröffentlichungen Gilsons (1893)[1]) eine starke Stütze.

Gilson unterwarf zerkleinerte Pflanzenteile einer komplizierten Reinigung, worauf hier nicht näher einzugehen ist. Auf Grund seiner Untersuchungen kommt er dann zu dem Schluß, daß Zellulose ein einheitliches chemisches Individuum sei. Sie ist nach ihm in allen Membranen als Hauptbestandteil vorhanden und zwar in den Verdickungsschichten mit anderen Stoffen zusammen, dagegen im Innenhäutchen chemisch rein.

Nach dem Produkt der hydrolytischen Spaltung seiner Zellulose verschiedener Herkunft, das immer ausschließlich Dextrose war, nannte er sein gereinigtes Ausgangsprodukt Dextrosozellulose; er stellte es der Reservezellulose E. Schulzes gegenüber.

Dieser Gilsonschen Ansicht sind inzwischen viele Gegner erstanden. Wie aus der unten folgenden Zusammenfassung der neueren Forschungsergebnisse der Zellulosechemie ersichtlich wird, können wir die „Dextrosozellulose“ nicht mehr als ein chemisches Individuum auffassen, sondern müssen in ihr einen Komplex zahlreicher Stoffe sehen, welche nur die allgemeinen Eigenschaften der „normalen Zellulose“ besitzen.

Glücklicherweise war ich durch das gerade zu Beginn meiner Arbeit erschienene große zusammenfassende Werk von Schwalbe, „Die Chemie der Zellulose“[2]), in die günstige Lage gesetzt, die Ergebnisse der hierauf bezüglichen zahlreichen Einzelforschungen übersichtlich gruppiert und kritisch gesichtet zu finden, so daß ich mich begnügen konnte, nur einen Teil der Originalarbeiten heranzuziehen.

Die Einteilungen der aus den Rohstoffen abgeschiedenen „eigentlichen Zellulosen“ sind nach Schwalbe alle mangelhaft. Höchstens die von Cross und Bevan aus dem Jahre 1903 herrührende hat noch eine gewisse Berechtigung.

1) Gilson, La Cristallisation de la Cellulose. 1893. La Cellule, Bd. 9, S. 397.
2) Schwalbe, C. G., Die Chemie der Zellulose. Berlin.

Aus diesem Grunde bedürfen wir einer neuen Übersicht der als echte Zellulosen aufzufassenden Stoffe, und zwar soweit dies möglich nach chemischen und physikalischen Gesichtspunkten.

Die weitaus meisten chemischen Untersuchungen sind mit der aus Baumwolle (Pektozellulose) isolierten echten Zellulose angestellt worden, da diese relativ leicht durch Bäuchen rein zu erhalten ist. Dieser Stoff gilt ziemlich allgemein als unveränderlich und resistent. Aber in neuerer Zeit greift immer mehr die Erkenntnis um sich, daß schon durch oft nur sehr unscheinbares Zusammenwirken physikalischer und chemischer Faktoren[1]) aus der so abgeschiedenen Zellulose eine große Zahl von Derivaten entstehen kann.

Aus der Fülle dieser mehr oder minder stark veränderten Zellulosen kommen für unsere Zwecke drei Gruppen von chemischen Stoffen in Betracht, da ihre Gesamtheit die „echte Zellulose" der Biologie darstellt:

I. Hydratzellulosen, II. Hydrozellulosen und III. Oxyzellulosen.

Es sei vorher bemerkt, daß die Chemie auch über die Natur dieser Stoffe noch lange nicht das letzte Wort gesprochen hat. Trotzdem läßt sich die auf Grund der bisher bekannten Eigenschaften im vorliegenden angewandte Systematik wohl als natürliche bezeichnen.

I. Aus Hydratzellulosen[2]) besteht der größte Teil der unter dem Namen Zellulose gehenden Zellulose-Abkömmlinge. (In der Literatur wechselt dieser Name vielfach mit „Hydrozellulose" ab.) Wir definieren darunter mit Schwalbe die Derivate, welche in ihrer Elementarzusammensetzung nicht (oder kaum) von der Baumwollzellulose abweichen, wie diese kein Reduktionsvermögen haben, jedoch mehr hygroskopisches Wasser enthalten. (Sie enthalten 8—12 % Wasser, gegenüber 6 % in natürlicher Baumwollfaser.) Eine chemische Bindung von Wasser findet nicht statt.

Die Einteilung dieser Quellungszellulosen muß vorläufig nach ihrer Darstellung geschehen. Es ergeben sich hierbei ungefähr folgende Gruppen:

1. Bildung durch mechanische Zerkleinerung bei Gegenwart

1) Wirken z. B. nur Feuchtigkeit, Luft und Sonnenlicht (bes. blaue Strahlen) zusammen, so erfolgt allmähliche Oxydation, die bis zu völliger Aufzehrung der Zellulose gehen kann. S. Witz, Bulletin d. l. soc. industr. de Rouen, 11, 1883, 190. — Schwalbe, Chemie d. Zellulose, S. 6.

2) Schwalbe, a. a. O., S. 160—211 u. a. a.

von Wasser, durch Trocknen von gebleichter Baumwollzellulose bei verschiedenen Temperaturen. — 2. Bildung durch Einwirkung von Salzlösungen, z. B. von Chlorzink. — 3. Bildung durch Einwirkung von Alkalien. — 4. Bildung durch Abscheidung aus Lösungsmitteln. — 5. Bildung durch Abscheidung aus Estern. — 6. Bildung durch Einwirkung von Säuren.

II. Die Hydrozellulosen[1]) bilden sich durch Aufnahme chemisch gebundenen Wassers. Diese kann man bewirken durch Behandlung mit flüssigen Säuren von geringerer Konzentration bis zu 70 % bei nach Umständen wechselnden Temperaturen oder mit Säuredämpfen; ferner auch durch Erhitzen mit Säuren und neutralen Salzen.

Die charakteristischste Eigenschaft der Hydrozellulosen ist ihre große Brüchigkeit, welche ein leichtes Zerreiben und Zerstoßen ermöglicht.

Als weitere Erkennungsmittel können neben dieser geringen mechanischen Festigkeit zunächst im Gegensatz zu Hydratzellulose und reiner Baumwollzellulose das starke Reduktionsvermögen gegen Fehlingsche Lösung und gegen ammoniakalische Silberlösung und der geringe Prozentgehalt hygroskopischen Wassers (durchschnittlich ca. 3 %) dienen. Ferner tritt mit Jodjodkalium keine Blaufärbung und mit Chlorzinkjod nur eine ganz unbeständige violette Färbung auf.

Gesteigertes Aufnahmevermögen für basische Farbstoffe hat die Hydrozellulose im Gegensatz zur Hydratzellulose mit der unten behandelten Oxyzellulose gemein.

III. Als dritte Gruppe der weit verbreiteten Derivate kommt für uns die der Oxyzellulosen[2]) in Betracht.

Diese entstehen aus Baumwolle und anderen Zellulosen durch Einwirkung chemischer Oxydationsmittel, wie z. B. Chlorkalk, Bromwasser, Salpetersäure, Kaliumchlorat, Chromsäure, Permanganat u. dergl.

Zu ihrer Erkennung gibt es eine Reihe von Reaktionen:

Bei Behandlung mit heißen Alkalilaugen tritt eine deutliche goldgelbe Färbung auf[3]). Ebenso bei dem in der Technik vielfach

1) Schwalbe, a. a. O., S. 211—221 u. a. a. — Köbner, Karbonisation, 1852. S. Zeitschr. f. angew. Chemie, 20, 2170 (1907).

2) Schwalbe, a. a. O., S. 221—257 u. a. a. — Witz, Bulletin d. l. Soc. industr. de Rouen, 11 (1883), 190.

3) Freiberger Färberzeitung, 22, 1911, S. 323 ff.

angewandten Dämpfen und Kalandern. Mit Phenylhydrazin in essigsaurer Lösung bilden sich gelbe Hydrazone (Nachweis der CO-Gruppe). Gegen Fehlingsche Lösung besitzen die Oxyzellulosen starkes Reduktionsvermögen (wenn man ca. $^1/_4$ Std. kocht), basische Farbstoffe (z. B. Methylenblau, Safranin) werden von ihnen kräftig gespeichert, wohingegen substantive Farbstoffe (Diaminblau, Geranin) abgestoßen werden.

Aus der Gesamtheit der Analysen kann man vorläufig nur den relativen Sauerstoffreichtum der Verbindungen entnehmen.

Reine Oxyzellulosen haben sich bisher überhaupt noch nicht darstellen lassen, alle bisherigen Präparate sind keine einheitlichen Körper, sondern Gemenge von α-, β- und γ-Oxyzellulosen[1]).

Aus dem Vorstehenden ergibt sich, daß ich mich nicht wie die oben genannten Autoren mit der landläufigen Ansicht begnügen konnte, daß im schwedischen Filtrierpapier annähernd reine Zellulose vorhanden sei, sondern daß ich zahlreiche Zellulosen verschiedener Herkunft für meine Experimente verwenden mußte, und diese nach den angeführten Gesichtspunkten physikalisch und chemisch zu untersuchen und charakterisieren hatte.

I. Die erste Gruppe der von mir verwendeten Zellulosen umfaßte echte Zellulosen, wie sie im Handel zu haben sind und bereits eine größere Reihe technischer Prozesse durchgemacht haben. Hierbei war meist sowohl die mechanische Struktur als auch die chemische Zusammensetzung der Stoffe mehr oder weniger oberflächlich verändert worden. Durch besondere Behandlung wurden diese Stoffe vor der Verwendung zum Teil von ihren Verunreinigungen befreit oder ausgesprochen chemisch verändert. Diese Zellulosen fanden Anwendung in Gestalt mehrerer Fließpapiere verschiedener Herkunft, Behandlung und Zusammensetzung, Pergamentpapier, Verbandwatte und Leinwandfäden.

II. Ferner verwendete ich gallertige Zellulose, die aus Kupferoxydammoniaklösung ausgeschieden worden war.

1) Nastjukoff, Ber. d. Deutsch. Chem. Ges., Bd. 33 (1900), 2237. — Derselbe, a. a. O., Bd. 34 (1901), 719, 3589 ff.

C. F. Cross und E. F. Bevan, Researches on Cellulose, Part. I—III. London 1912.

Tollens, Handbuch der Kohlehydrate, 2. Aufl., Bd. 1.

E. Schulze, Steiger, Maxwell, Zur Chemie der Pflanzenzellmembran. Zeitschr. f. physiol. Chemie, Straßburg 1890—94, XIV, XVI, XIX.

III. Im weiteren untersuchte ich natürliche Zellulosen, wie sie unverändert in pflanzlichen Gebilden vorkommen, und zwar in den Bastzellen der Linde und des Leins, in den verschiedenen Zellmembranen der *Clivia*-Blätter, der *Impatiens*-Stengel *(I. glanduligera)* und der *Sambucus*-Blätter.

IV. Dazu kam natürliche tierische Zellulose, wie sie im Mantel der *Phallusia mammillata* vorkommt.

Zur weiteren Ergänzung der Versuchsergebnisse wurden auch herangezogen:

V. Einige Hemizellulosen: 1. aus Dattelkernen (Endosperm von *Phoenix dactylifera*) und 2. aus Kaffeebohnen (Endosperm von *Coffea arabica*).

VI. Verkorkte Membranen: aus „Flaschenkork" von *Quercus suber* und verholzte Membranen: Holz von *Tilia*.

II. Die zu den Versuchen verwendeten Pilze.

1. Herkunft und Gewinnung der Reinkulturen.

Ausgehend von der Tatsache, daß Zellulose (im weiteren Sinne des Wortes) im Boden unserer Wälder reichlich dauernd zersetzt wird, isolierte ich aus dem Humus eine größere Zahl der dort vorkommenden Pilzformen. Denn vorausgesetzt, daß es Pilze mit der fraglichen Eigenschaft des Zelluloselösungsvermögens überhaupt gibt, konnte man ihr natürliches Vorkommen vor allem hier vermuten.

Um Pilze daraus zu isolieren, wurden Fließpapierblätter in Petrischalen mit schwacher mineralischer Nährlösung getränkt.

Diese blieben mehrere Stunden im Garten und in den Gewächshäusern offen stehen, oder es wurden teilweise verweste Pflanzenteile aus dem Humus von Laub- und Nadelwäldern über so vorbereitete Petrischalen ausgeschüttelt resp. mit sterilem Pinsel abgebürstet.

Hierdurch gelangten neben Bakterien vorwiegend Sporen der typischen Humuspilze auf das Fließpapier, und nachdem die Schalen einige Tage gut verschlossen im kühleren Zimmer gestanden hatten, waren neben Bakterienkulturen zahlreiche Pilzmycelien entstanden, die sich zum Teil gut entwickelten und bald reichlich Sporen bildeten.

Aus diesen Mischkulturen wurden nach dem von Hagem[1]) ausgestalteten Verfahren Reinkulturen der Pilze hergestellt:

Mit einer Platinöse wurden Sporen in einen Kolben mit sterilisiertem Wasser gebracht. Nach kräftigem Umschütteln wurden einige Kubikzentimeter des sporenhaltigen Wassers in einen neuen Kolben mit sterilem Wasser gegossen. Von dieser Flüssigkeit wurden einige Tropfen in sterile Petrischalen gebracht, die sauren Malzagar enthielten. Infolge der weitgehenden Verteilung der Sporen gelang es so, von jedem Pilz viele Mycelien als Einzelkulturen zu gewinnen.

Durch oft wiederholtes Überimpfen der Sporen auf sauren Malzagar wurden schließlich völlig bakterienfreie Reinkulturen der Pilze gewonnen.

2. Bestimmung der Formen.

So erlangte ich eine größere Zahl von *Fungi imperfecti.* Von diesen kultivierte ich die gut wachsenden Hyphomyceten (Fadenpilze) weiter. Bei mikroskopischer Untersuchung zeigte sich, daß sie hauptsächlich zu den Mucedinaceen und Dematiaceen gehörten, jedoch war auch eine Stilbaceenform darunter.

Von den besser bekannten Pilzen gelangte ich in den Besitz von Reinkulturen mehrerer Ascomyceten und Phycomyceten.

Um meine Versuche auf andere Formen ausdehnen zu können, stellten mir Herr Professor Claußen *Pyronema* und Herr Professor Reinhardt noch einige andere Pilze gütigst zur Verfügung.

Die systematische Bestimmung der Pilze erfolgte nach Rabenhorst, Kryptogamenflora, II. Aufl., Abt. VIII und IX (Lindau), Leipzig 1907—10, Englers natürlichen Pflanzenfamilien, I. Teil, 1. Abt. (Lindau), Saccardo, Sylloge Fungarum, Vol. IV unter Zuhilfenahme anderer Pilzwerke und Einzelarbeiten.

Stemphylium macrosporoideum (Berk.) hat anfänglich hyaline, ungleichmäßig verzweigte Hyphen mit zart grünlichem Schimmer, die sich aber später schwach graubraun färben (Dematiaceae). Als Konidienträger dienen seitliche, niederliegende Myceläste, die endständig eine etwa maulbeerförmige, kastanienbraune, undurchsichtige Spore tragen, welche meist übers Kreuz in vier Zellen geteilt ist. Wie ich mich überzeugt habe, kann jede von diesen vier Zellen einen Keimschlauch bilden.

1) Hagem, a. a. O., S. (6).

Die Pilze dieser Gattung gelten als Saprophyten, nach Lindau kommen sie aber vielleicht auch auf noch lebenden Blättern vor.

Mycogone zeichnet sich durch hyaline, im Alter auch graubräunlich gefärbte, vielfach septierte Hyphen von 3—6 μ Durchmesser aus. Die Sporen sind in der Regel ungleich zweizellig, aber auch einzellig, sitzen an kurzen oder längeren niederliegenden Seitenästen auf kugelförmig oder blasig angeschwollenen Endzellen und sind bräunlich gefärbt.

Die *Mycogone*-Spezies kommen nach Lindau auf anderen Pilzen, ferner auf Kot und Laub vor.

Es ist ungewiß, ob der vorliegende Pilz tatsächlich zur Gattung *Mycogone* zu stellen ist, möglicherweise handelt es sich um *Dicoccum Corda.*

Stachybotrys alternans besitzt sehr zartes, hyalines, septiertes Mycel, das auf dem Substrat dahinkriecht. Die Hyphen sind 3—5 μ dick. Fruktifizierende Hyphen sind dickwandig, großlumig (bis 7 μ) und dunkelbraun gefärbt. Sie sitzen mit einer großen, besonders verdickten, verzweigten Sockelzelle am Mycel. Die Konidienträger sind beinahe regelmäßig wickelig verzweigt. Jeder Seitenast hat am Ende zahlreiche blasige Sterigmen, deren jedes eine große, schwarze, ellipsoidische Spore mit stacheligem Exospor trägt.

Die Form ist nach Lindau weit verbreitet, und findet sich während des ganzen Jahres; sie kommt in der Regel auf feuchtem Papier, alten Stricken u. dergl. vor.

Trichoderma lignorum (Tode) hat septierte, kriechende Hyphen, deren Seitenzweige zu einem dichten, hyalinen Rasen verflochten sind. In gewissen Abständen bilden sich besonders dichte, anfänglich weiche Hyphenkissen, die sich allmählich gelblich, dann grünlich und später ganz spangrün färben. Unter dem Mikroskop geben sich diese Kissen als Anhäufungen von Konidienträgern zu erkennen.

Die Konidien sind kugelig, von grüner Farbe und haben ca. 3 μ Durchmesser. Sie werden auf flaschenförmigen Trägern gebildet, die in gewissen Abständen als Seitenzweige zu zweien und dreien vereint an einer Hauptachse entstehen.

Die Form hat nach der Literatur ihr natürliches Vorkommen auf Humus, anderen faulenden Pflanzenteilen und auf Holz.

Botrytis cinerea Pers. zeichnet sich durch scharf vom grauen Mycel sich abhebende, bräunliche, unregelmäßig verzweigte Konidienträger aus, welche die eiförmigen Konidien auf kleinen Warzen tragen.

Zuweilen bildet der Pilz Sklerotien, die meist flach und weit ausgebreitet sind (von Millimetergröße bis zu mehreren Zentimetern) und an Luft außen schwarz werden *(Sclerotinia)*. Apothecienbildung seitens der Sklerotien fand in keinem der Versuche statt.

Der Pilz ist Kosmopolit; er ist auf vielen lebenden und toten Pflanzenteilen beobachtet worden.

Trichothecium roseum hat lange, dünne Hyphen von rosa Farbe; diese sind reich und unregelmäßig verzweigt.

Die rosa Konidien entstehen durch zunächst keulenförmige Ausschwellung eines Hyphenendes. Das blasige Ende trennt sich durch eine Querwand ab, wächst dann in die Länge und bildet darauf eine zweite Querwand, die eine gürtelförmige Einschnürung der Spore hervorruft. Dicht unterhalb der Ansatzstelle der zweizelligen Spore bildet sich darauf ein neuer blasiger Auswuchs, welcher die gleiche Entwickelung durchmacht; durch vielfache Wiederholung entsteht endlich eine dichte, traubige Anhäufung von Konidien. In der Natur kommt der Pilz nach Lindau auf trockenem Laub und auch gepreßten Pflanzen vor. Von letzteren wurde die vorliegende Form isoliert.

Cladosporium herbarum I wurde im Herbst von einem Pappelblatt isoliert, auf dem *Cl.* im Mesophyll wuchs und seine Konidien tragenden Hyphen durch die Spaltöffnungen hinaus schickte.

Das Mycel ist dunkelbraungrün gefärbt und auf geeignetem Substrat nur in der Jugend hyalin. Die Hyphen sind knotig von sehr verschiedener Dicke. Die Konidien entstehen auf unregelmäßig höckerigen Trägern. Sie sind 1—4zellig und bilden vielfach kurze Ketten.

Der Pilz kommt nach Lindau als Saprophyt auf der ganzen Erde vor, ist aber auch parasitisch wachsend beobachtet worden.

Cladosporium II (Hormodendron) wurde im Garten aus der Luft isoliert. Der Pilz entwickelt auf allen Substraten kurzzellige, dunkelbraun gefärbte Hyphen. Die Konidien entstehen auf verzweigten Konidienträgern in Ketten, die durch Sprossung weiter

wachsen. Die Konidien sind eiförmig bis langgestreckt, 5—10 μ lang und 3—5 μ breit.

Von der Gattung *Penicillium* Link wurden vier Species untersucht, die nicht alle genau bestimmt wurden.

Penicillium I zeichnete sich durch weißes Mycel aus, das aber in fast allen Fällen sich nach kurzer Zeit mit einem dichten Pelz grauer Konidienträger überzog.

Penicillium II entwickelte grüne Konidien. Es ist vielleicht mit dem von Delacroix (Bull. Soc.-Myc. France, VII, 107, 1891) beschriebenen *P. Duclauxi* identisch.

Die Sporen sind olivgrün, kugelig (Durchmesser 2,5 bis 3 μ) und besitzen ein kleinwarziges Exospor. Die Konidienträger waren in allen Versuchen zu Koremien vereinigt. Dies Verhalten spricht für die von Wächter, Link, Corda u. a. vertretene Ansicht, daß die Koremien bei bestimmten Arten immer aufträten (im Gegensatz zu Lindau und Brefeld, welche Koremien für zufällige Bildungen halten), und daß daher die durch Koremienbildung ausgezeichneten Penicillien als besondere Gattung „*Coremium*“ abzuspalten seien. In den meisten Fällen schied der Pilz ein Pigment aus. Dies war in einigen Kulturen gelb, in anderen orange gefärbt.

Die beiden anderen *Penicillium*-Spezies: *Penicillium III* und *IV* wurden nicht genau bestimmt, da sie die Zellulose in keinem der Versuche zu lösen vermochten.

Von den Ascomyceten untersuchte ich (außer den schon oben als Hyphomyceten behandelten Pilzen) das in morphologischer und entwicklungsgeschichtlicher Beziehung so gut bekannte *Pyronema omphalodes* (= *confluens*). Der Pilz bildet kräftige, wattige, vegetative Hyphen. Er wurde als Hyphe übergeimpft, da er keine Konidien und auch Ascosporen nur spärlich bildete.

Von den *Aspergillus*-Arten wurde der kosmopolitische *Aspergillus niger (I)* und eine weitere gelbe Form *Aspergillus spec. II* verwendet. Diese letztere zeichnete sich durch unverzweigte Sterigmen und gelbe Sporen mit warzigem Exospor aus. Der Pilz ließ sich mit keiner der von Wehmer (Die Pilzgattung *Aspergillus*. 1901. Mém. d. l. Soc. Phys. et d. Hist. Nat. Genève, XXXIII, Nr. 4) angeführten Formen identifizieren.

Von den niederen Pilzen, den Phycomyceten, untersuchte ich mehrere *Mucor*-Arten und *Rhizopus*.

Diese niederen Pilze, die bekanntlich auf Obst und modernden Pflanzen vielfach vorkommen, auch auf Brot, Stärkekleister und niederen Kohlehydraten (Zucker) vielfach sehr gut gedeihen, mußten untersucht werden, da über ihr Verhalten gegen höhere Kohlehydrate auseinandergehende Mitteilungen vorliegen.

Mucor I und *II* waren von Obst isoliert worden, sie zeigten beide auf allen verwendeten Medien nur bescheidenes Wachstum.

Mucor III war von Gewöll isoliert worden. Er hatte ca. 2 cm lange Konidienträger und hyaline Sporen von ca. 4 μ Durchmesser. Die Spezies wurde nicht bestimmt.

Mucor spinosus wurde von zwei verschiedenen Herkunftsorten untersucht. Er ist als eine der gemeinsten Mucorineen schon 1876 von van Tieghem beschrieben worden. Beide von mir verwendeten Formen *A* und *B* bildeten auf Malzagar graue Rasen mit zahlreichen reich traubig verzweigten Sporangienträgern, welche ca. $^1/_2$—1 cm hoch wurden. Die kugeligen Sporen hatten einen Durchmesser von ca. 6 μ. Zygosporen wurden nicht erhalten.

Ebenso gemein wie diese Formen ist die Gattung *Rhizopus*, von der eine nicht näher bestimmte Spezies verwendet wurde, wahrscheinlich *Rh. nigricans*. Sie hatte deutlich gegliederte Ausläufer; Rhizoiden waren immer entwickelt. Die Konidienträger waren auf Malzagar ca. 1—2 mm lang und ca. 10—15 μ dick. Die Sporangien besaßen einen Durchmesser von 100 μ und waren im reifen Zustande von schwarzer Farbe.

III. Die ernährungsphysiologischen Versuche.

1. Allgemeine Versuchsanordnung.

In der Anordnung meiner Versuche konnte ich nicht den beiden Autoren folgen, welche vor mir eine Lösung unserer Frage erstrebten. Das widersprechende Endergebnis ihrer Versuche erklärt sich vielleicht gerade aus den gewählten Versuchsmethoden.

Die von Iterson[1]) gewählte Methode bietet bei der notwendigen langen Versuchsdauer nur ungenügende Gewähr, daß die Kulturen tatsächlich steril bleiben, und die Deckglaskulturen

1) Iterson, a. a. O., S. (4).

Schellenbergs[1]) erlauben überhaupt nur eine kurze Versuchsdauer.

Aus diesen Gründen wählte ich für meine endgültigen Versuche nur Kulturen in Erlenmeyer-Kolben und in Reagenzröhrchen, die mit Wattebauschen verschlossen waren.

Die verschiedenen Zellulosesubstrate wurden, wie es bei ernährungsphysiologischen Versuchen üblich ist, mit mineralischer Nährlösung den Pilzen dargeboten. Hierbei dienten sie teilweise als einzige Kohlenstoffquelle, teilweise wurden der Nährlösung andere, und zwar lösliche Kohlenstoffverbindungen zugesetzt.

Die hauptsächlich verwendete Nährlösung enthielt in destilliertem Wasser:

0,5 % KH_2PO_4,
0,5 „ NH_4NO_3,
0,2 „ $MgSO_4$,
0,2 „ $CaCl_2$,
Spur: $FeSO_4$.

In einigen Versuchen war diese Lösung auf $^1/_{10}$ verdünnt.

Die Lösung mit variierter N-Quelle war ohne NH_4NO_3 hergestellt, und enthielt je nach dem Versuch:

entweder 0,1 % KNO_3 oder
0,1 „ $(NH_4)_2PO_4$ „
0,1 „ Glykokoll „
0,1 „ Asparagin „
0,1 „ Pepton

bei doppelter Konzentration der Mineralstoffe.

Da sich im Laufe der Untersuchungen zeigte, daß der Zutritt der Luft für das Pilzwachstum von Einfluß war, mußte bei den ungelösten Kohlenstoffquellen dem Niveau der Nährlösung besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden.

Aus diesem Grunde wurde meist Zellulose in langen Streifen verwendet und so an der Glaswand befestigt, daß ein Ende in die Lösung tauchte, während das andere weit in die Luft hineinragte. War dies, wie bei Verwendung von Zellulose in Breiform oder Rasiermesser-Schnitten, nicht möglich, so mußte beachtet werden, daß keine zu große Flüssigkeitssäule das Niveau von den Zellulosepartikeln trennte, damit die Hyphen das Substrat erreichen konnten.

1) Schellenberg, a. a. O., S. (3).

In mehreren Fällen wurden Scheiben von Fließpapier auch dadurch an die Oberfläche der Nährlösung gebracht, daß ein Knäuel Glaswolle darunter gelegt wurde.

2. Die Ausnutzung der Zellulosen als C-Quellen.

a) Technisch oder chemisch veränderte echte Zellulosen.

α) Hydratzellulosen als Fließpapier.

Die Reihen der Versuche, bei denen Zellulose in Form von Fließpapier gegeben wurde, lassen sich in drei Gruppen teilen. In der 1. Gruppe wurde gereinigtes Fließpapier als einzige Kohlenstoffquelle gegeben, und die Nährlösung mit größter Vorsicht hergestellt, damit keine organische Verunreinigung hinein gelangte. In der 2. Gruppe wurde gewöhnliches ungereinigtes Fließpapier, außerdem Leitungswasser für die Nährlösung verwendet. In der 3. Gruppe wurde außer Zellulose noch eine andere lösliche C-Verbindung der Nährlösung zugefügt.

Das verwendete Fließpapier war sehr reines Material. Die Prüfung nach den von Haußner[1]), Herzberg[2]), Kirchner[3]), Schubert[4]) u. a. angegebenen Methoden ergab, daß weder Holz-, noch Stroh-, Jute-, Esparto-Faser vorhanden war. Es enthielt vielmehr zu etwa 90—95 % Baumwoll- und als Rest Leinenfaser. Der Stoff war sicher nicht stark gemahlen (gekollert), wie der Erhaltungszustand der Faser zeigte, und frei von Füllstoffen.

Das Fließpapier der 1. Versuchsgruppe stellte in der Hauptsache Hydratzellulose des 1. Typus dar, doch war ein geringer Gehalt an Oxyzellulose bei der Reinigung nicht entfernt worden. Einen Anhalt über die äußerst geringe Menge dieses Stoffes ergab neben der Schwäche der Reaktionen die nachträglich erfolgte Behandlung mit 10 % NaOH. Hierdurch wurde weder eine Gewichtsabnahme bedingt, noch konnte unter dem Mikroskop Herauslösung irgendwelcher Partien beobachtet werden. Das in einer Versuchsreihe (V. 39) verwendete Fließpapier enthielt weder Oxyzellulose noch Hydrozellulose in nachweisbaren Mengen. Erstere, die in

1) Haußner, Prüfung des Papieres (S. 1630—1687), 1905. Aus Karmarsch, Handb. d. mechan. Technologie. Berlin 1897—1905.

2) Herzberg, Papierprüfung. Berlin 1907.

3) Kirchner, Das Papier (Holzschliff, Zellstoff).

4) M. Schubert, Zellulosefabrikation, 3. Aufl. Berlin 1906.

gewöhnlichem Fließpapier stets vorhanden ist, war offenbar durch die Laugebehandlung herausgelöst worden, andererseits hatte die geringe Konzentration der Lauge keine Merkerisation bewirken können. Die (in V. 13) als Brei verwendete Zellulose war in der Hauptsache Hydratzellulose. Sie war oxyzellulosefrei, enthielt jedoch eine nicht genau meßbare Menge von Hydrozellulose, welche sicher durch Umwandlung der Faseroberfläche bei der Säurebehandlung entstanden war. Die für die 2. und 3. Versuchsgruppe verwendeten Fließpapiere bestanden auch in der Hauptsache aus Hydratzellulosen, sie enthielten aber, wie die Reaktionen zeigten, in geringen Mengen auch Hydro- und Oxyzellulosen. Fehlingsche Lösung wurde reduziert und Methylenblau gespeichert. Mit Phenylhydrazin entstand eine schwach gelbe Färbung, ebenso mit Kalilauge; auch die Furfurolreaktion trat ein.

Das verwendete Fließpapier stellte also, wie wir aus den Reaktionen ersehen, in der Hauptsache Hydratzellulose vom Schwalbeschen Typus I dar.

Das allmähliche Gedeihen der Pilze wurde genau verfolgt und in Tabellen verzeichnet. Im folgenden sei nur ihr allgemeines Verhalten dargestellt.

Stemphylium zeigt in allen Versuchen die Fähigkeit, die Zellulose des Fließpapiers vorzüglich als C-Quelle auszunutzen.

Bei Verwendung von Streifen ungereinigten Fließpapiers wuchs der Pilz gleich von Anfang an gut, fand also geeignete C-Verbindungen zur sofortigen Verarbeitung vor. Schon nach 7 Tagen war das ganze Papier überwuchert worden und es hatten sich reichlich Konidien gebildet.

Auf dem Niveau der Nährlösung bildete sich durch langsames Vorwachsen vom Papierstreifen her eine anfänglich zarte Hyphendecke. Diese bildete an der Luft bald Konidien. Wenn durch Anstoßen der Kultur die Decke versank, was wiederholt vorkam, dann wuchsen die weißen vegetativen Hyphen wieder bis zum Spiegel empor und bildeten dort von neuem Konidien. So entstand mit der Zeit eine dicke, oberflächlich schwimmende Hyphendecke. Wo diese am Papier festsaß, erfolgte ein heftiger, schon nach ca. 1 Monat mit bloßem Auge deutlich erkennbarer Angriff auf die Zellulose. Letztere wurde so stark gelöst, daß das Papier glasig und durchscheinend wurde. Die mikroskopische Unter-

suchung solcher Stellen zeigte, daß die Faser hier ganz aufgelöst worden war.

Von dieser mittleren Zone des Reagenzrohres verhielten sich die beiden anderen abweichend. Am oberen trockenen Rande schritt das Wachstum unter schwacher Konidienbildung nur langsam fort, und auch submers überzog sich das Papier nur mit einer dünnen Schicht kurzer, ausschließlich vegetativer Hyphen. In beiden anderen Regionen war die Auflösung der Papierfaser eine geringere (Taf. V, Fig. 1), sie nahm aber beiderseits bis zur Mittelregion zu. So zeigten sich die verschiedensten Grade des Angriffes auf die Faser, welche an jeder Stelle der aufsitzenden Mycelmenge entsprach.

Das gereinigte Fließpapier zeigte dem Pilz gegenüber genau das gleiche Verhalten. Auch hier setzte sogleich ein kräftiges Pilzwachstum ein.

In einem Versuch enthielt die Nährlösung außer den Mineralstoffen noch einen Glukosezusatz (0,25 %). Hierbei traten keine Veränderungen mit Rücksicht auf vegetatives Wachstum und Zellulosebildung ein. Ein Unterschied zeigte sich jedoch bei der Bildung der Konidien, indem diese schneller und bedeutend reichlicher entstanden.

Bei Zusatz von 0,05 % Malzextrakt trat ungefähr derselbe Erfolg ein: Auf nur unbedeutend schnelleres Wachstum im Vergleich zur Kultur, die keinen Zusatz löslicher C-Verbindungen enthielt, folgte auch hier vollkommene Auflösung der Zellulose in der Niveauregion.

Abweichend hiervon verhielt sich der Pilz bei Gegenwart größerer Mengen löslicher C-Verbindungen (z. B. 5 % Malzextrakt) in der Lösung. Obgleich sehr kräftiges Mycelwachstum erfolgte, fand keine Auflösung der Zellulose statt. Selbst nach 10 Monaten war die Faser des Papiers noch unverändert. Ob auch in diesem Versuche die Zellulose nach Aufzehrung der vorgezogenen löslichen C-Quellen schließlich angegriffen würde, wurde nicht festgestellt, da infolge des Verbrauchs der Mineralstoffe das Pilzwachstum nach einigen Monaten keine Fortschritte mehr machte. Der Pilz hatte also auch kein Bedürfnis mehr, sich weiteren C anzueignen.

Dieses eigentümliche Verhalten des Pilzes ließ zusammen mit weiter unten angeführten Beobachtungen anderer Formen die Vermutung aufkommen, daß durch die Gegenwart großer Mengen löslicher Stoffe, welche eine bequeme Kohlenstoffquelle für den Pilz

bilden, die Enzymausscheidung offenbar unterbunden wird. Dieser Hinweis auf regulatorische Enzymsekretion gab darum die Anregung zu weiteren Untersuchungen.

Um die Wachstumsbedingungen noch weiter zu erforschen, wurde der Pilz in Glaskolben auf Zellulosebrei aus ungereinigtem und extrahiertem Fließpapier kultiviert. Durch wiederholtes Schütteln der Kulturen konnte der Pilz bei dieser Versuchsanordnung mit allen Teilen des Zellulosebreis in innige Berührung gebracht werden, was sich mit den unteren Enden der Papierstreifen in den Reagenzglaskulturen nicht erreichen ließ. Der Erfolg war, daß sich die gesamte Zellulosemenge von 2,5 g Trockengewicht in Lösung bringen ließ.

Mycogone zeigte in allen Versuchen die Fähigkeit, bei Gegenwart der Mineralstoffe in geeigneter Form die Zellulose des Fließpapiers auszunützen. Ein Unterschied zwischen gereinigtem und ungereinigtem Fließpapier zeigte sich nicht. Gleichgültig war es auch für den Pilz, ob viel oder wenig Oxyzellulose vorhanden war. Bei Gegenwart von Glukose in geringerer Konzentration (1 %) erfolgte dieselbe vollkommene Auflösung der Zellulose.

Mycogone besaß von allen untersuchten Pilzen das intensivste Zelluloselösungsvermögen. Dies hängt offenbar mit seiner Fähigkeit zusammen, auch submers kräftige, dichte Watten zu bilden, wohingegen sich die anderen Pilze mehr zur Luft hindrängen und dort oberflächlich schwimmende Myceldecken entwickeln. Ist dieser Pilz hierdurch geeignet, das untere submerse Ende der Zellulosestreifen bequem zu lösen, so zeigt er am oberen trockenen Rande in Übereinstimmung mit den anderen Pilzen nur ein spärliches Wachstum und greift die Zellulose hier entsprechend wenig an.

Gerade so wie die ersten beiden Pilze ist auch *Stachybotrys* in hohem Maße befähigt, das Fließpapier zu zerstören. Der Pilz entwickelte sich in allen Kulturen zunächst am Papier, soweit es in die Luft ragte; dann schob sich vom Papier her eine zarte Mycelhaut im Niveau vor, die allmählich in die Dicke wuchs. Nach kurzer Zeit (z. B. nach 10 Tagen) bildeten sich an der Luft dunkle Konidien. Darauf kamen auch submers am Papier kurze, vegetative Hyphen zum Vorschein, die aber nur wenig zunahmen.

In der Niveauregion zeigte sich schon dem unbewaffneten Auge bald die Auflösung der Zellulose. In mehreren Versuchen wurde nach 30—40 Tagen, in anderen nach ca. 1½ Monaten Glasig-

werden des Papiers beobachtet, das nach unten in dem Maße zunahm, als das Niveau der Nährlösung und mit ihm die Mycelhaut sank.

Die mikroskopische Untersuchung solcher Stellen zeigte, daß nach ca. 2 Monaten zwischen einer ungeheuren Zahl dünner Hyphen nur noch geringe Reste von den zahlreichen Fasern des Papiers übrig geblieben waren. Bei älteren Kulturen war auch von diesen keine Spur mehr zu finden. In mehreren Versuchen wurde auch von *Stachybotrys* der Papierbrei nach einigen Monaten vollkommen aufgelöst. Statt seiner war eine kräftige Myceldecke entstanden, die schließlich die gesamte Flüssigkeit durchwucherte. Die Konidienbildung fand nur an Luft statt. Mit Sinken des Niveaus der Nährlösung bildeten auch die zuvor nur vegetativen untergetauchten Hyphen Konidien.

Enthielt die Nährlösung außer Zellulose noch 6 % Glukose, so unterblieb auch bei *Stachybotrys* die Auflösung der Zellulose, obwohl sich der Pilz gut entwickelte. Bei geringerem Glukosezusatz dagegen (0,25 %) zeigte das Papier schon nach kürzerer Zeit wie in dem Parallelversuch ohne Glukosezusatz das oben beschrieben glasige Aussehen.

Trichoderma bildete nach schnellem Keimen am Papierstreifen, besonders in der Niveauregion, bald kleine, weiße Mycelkissen bis zum Durchmesser von ca. 1 mm. Diese färbten sich bald gelb und darauf von der Mitte her hellgrün und erlangten schließlich ein tief dunkelspangrünes Aussehen, das von den inzwischen gebildeten kugeligen Sporen herrührte. Von den isolierten Kissen strahlten bald sternförmig zarte, hellgelbgrüne Hyphen aus und bildeten in unregelmäßigen Abständen wiederum Konidienkissen. Am oberen Papierstreifenende wurden nur langgestreckte, hyaline, vegetative Hyphenwatten gebildet. Auf der Flüssigkeit entstand eine gleichmäßig dünne, schwimmende Hyphendecke. Diese wuchs ständig in die Dicke und bildete bald auf der gesamten Oberfläche grüne Konidien. Submers wurden vom Papierstreifen aus flottierende, vegetative Hyphen in die Flüssigkeit gesandt.

Das Papier war im Niveau nach ca. 1 Monat stark glasig geworden oder bis auf den obersten trockenen Rand vollständig aufgelöst (vgl. Taf. V, Fig. 2).

Bei Darbietung der Zellulose in Breiform gelang es dem Pilz, die verhältnismäßig große Menge Zellulose (2,5 g) vollkommen in Lösung zu bringen.

Bei diesem Pilz wurden in mehreren Versuchen der Zellulose auch andere C-Quellen hinzugefügt. 0,05 % Malzextrakt beeinträchtigte nicht das Zelluloselösungsvermögen, ebensowenig Zusätze von 0,1 % Glykokoll, 0,1 % Asparagin, 0,1 % Pepton. Dagegen unterblieb die Auflösung des Fließpapiers bei einem Gehalt von 5 % Malzextrakt in der Nährlösung. (Weiteres s. u. bei Besprechung der Enzymreaktionen.)

Botrytis vermochte die Zellulose des Fließpapiers energisch zu lösen. Die Sporen hatten schon nach 2 Tagen reichlich lockeres, weißes Luftmycel gebildet. Nach weiteren 8 Tagen hatte sich dieses über das ganze Papier ausgedehnt und war besonders dicht und wattig am oberen Ende des Papierstreifens, über den es sich bis ca. 1 cm hinaus erstreckte; hier hatte sich am Ende der Hyphen eine Reihe kleiner Sklerotien gebildet. In der mittleren Region, dicht über der Flüssigkeit, waren die Hyphen lang gestreckt, von bräunlicher Farbe und hatten reichlich Luftkonidien gebildet. Zwischen Glas und Papier waren zudem zahlreiche kleine Sklerotien entstanden, die an der eng dem Glase angeschmiegten Seite dauernd die weiße Farbe behielten, während sie sich an allen anderen Stellen bei Berührung mit Luft an der Oberfläche in dünner Schicht schwarzbraun gefärbt hatten. Eine Myceldecke wie bei den anderen Pilzen wurde nicht gebildet. In der Nährlösung flutete ein hellbraunes, dichtes, wattiges Mycel am Papier.

Eine Abnahme der Zellulose konnte schon nach ca. 1 Monat festgestellt werden, die sich nach ca. 4 Monaten als eine weitgehende Auflösung zu erkennen gab. Dieselbe äußerte sich bei makroskopischer Betrachtung in einer starken Transparenz des Papiers, das sich aber noch von dem oben geschilderten Glasigwerden unterschied. Das gesamte in die Lösung tauchende Ende war aufgelockert und erweicht, wurde jedoch durch das umgebende Hyphengeflecht am Zerfall verhindert.

Die mikroskopische Untersuchung des Restes erfolgte erst, nachdem die ausgetrocknete Kultur einige Zeit gestanden hatte. Es ergab sich, daß in der dünnen Schicht verflochtener, kollabierter Hyphen nur noch geringe, stark aber ungleichmäßig korrodierte Faserreste verblieben waren. Die Korrosion hatte wiederum wie so oft an den Bruchstellen der Zellfasern mit einer Isolierung der Fibrillen begonnen und dann weiter um sich gegriffen. Hierdurch wurde zunächst die Membranoberfläche rillig und streifig, dann blieben nur noch lockere Fibrillenbündel übrig.

Der Pilz sendete einen starken, dumpfen Geruch aus, der an Phenol erinnerte.

Enthielt die Lösung außer Zellulose in Form von schwedischem Filtrierpapier auch noch 6 % Glukose, so entwickelte der Pilz schnell eine dicke Myceldecke und am Glasrand große Sklerotien. In die Luft hinein erstreckte sich wattiges Mycel, das nur spärliche Konidien bildete. Submers entstand eine größere Zahl von frei schwimmenden Mycelflocken. Trotz dieses überaus üppigen Wachstums zeigten sich an der Zellulose des Fließpapiers nach 4monatlicher Kultur noch nicht die geringsten Angriffe. Die submers reichlich vorhandenen Mycelflocken saßen daher auch nicht am Papier fest, wie in den glukoselosen Kulturen, sondern schwammen frei herum. Es zeigte sich also auch hier, wie bei obigen Pilzen, daß die Enzymausscheidung unterblieb, weil reichlich Glukose vorhanden war.

Trichothecium. Die Sporen keimten und entwickelten sehr langsam zarte Hyphen. Nach $1^1/_2$ Monaten waren am obersten Rande des Fließpapierstreifens nur wenige rosa gefärbte Konidienkissen gebildet. Das Wachstum blieb auch in der Folgezeit sehr bescheiden. Nach 3 Monaten konnte überall submers am Papier ein äußerst zarter Pilzrasen beobachtet werden, dessen einzelne Hyphen nur Bruchteile eines Millimeters lang waren. Nach $5^1/_2$ Monaten konnte durch mikroskopische Untersuchung an der Zellulosefaser kein Angriff konstatiert werden. Das geringe Wachstum war nur auf das Vorhandensein von Verunreinigungen zurückzuführen. Es war nicht bedeutender wie in dem Kontrollversuche ohne C-Zusatz. In Vergleichskulturen zeigte sich nur auf dem ungereinigten Papierbrei kräftigeres Wachstum, aber auch hier erfolgte kein Angriff auf die Faser, wie der mikroskopische Befund lehrte.

Bei Zusatz von Glukose (0,25 %) zur Nährlösung vermochte sich der Pilz gut zu entwickeln. Oberflächlich schwimmend bildete er eine Myceldecke mit zahlreichen rosa Konidienkissen und submers viele frei schwimmende kugelige Mycelflocken. Eine Korrosion der Faser erfolgte an keiner Stelle.

Cladosporium I vermochte am Fließpapier in Luft nur spärliche sternförmige Mycelien zu entwickeln; submers keimten sowohl am Zellulosesubstrat, als auch frei davon (am Glas) nur kurze Hyphen aus. Ein Angriff auf die Faser war selbst nach vielen

Monaten nicht zu beobachten. Auf dem Brei von ungereinigtem Filtrierpapier wuchs der Pilz einige Zeit weiter und bildete dunkle Hyphen, während er auf dem gereinigten Fließpapierbrei nicht gedeihen konnte. Die sehr kleinen Mycelflocken fanden hier sogar nicht einmal genügend Stoffe vor, um sich dunkel zu färben. Daß der Pilz nicht wegen geringer Wachstumsenergie notwendig so spärlich wachsen muß, wie in den Zellulosekulturen, zeigen die Kulturen mit Malzextraktzusatz. Bei 5 % Malzextrakt entwickelte sich ein kräftiges, krustiges, schwarzbraunes Mycel, bei 0,05 % ein weniger kräftiges.

Die mikroskopische Untersuchung ergab, daß in keinem der Versuche eine Korrosion der Faser stattgefunden hatte.

Cladosporium II überzog den Fließpapierstreifen schnell an seiner ganzen Oberfläche mit dichtem, braunem Mycel, das sich submers etwas langsamer entwickelte. An der Luft bildeten sich bald Konidien, die durch Knospung lange verzweigte Ketten bildeten, wohingegen die submersen Hyphen langfädig waren und nur an den Verzweigungsstellen knotige Anschwellungen zeigten.

Die mikroskopische Untersuchung ergab, daß die Zellulosefaser nach 3 Monaten ganz in Fibrillen aufgelöst worden war.

Penicillium I überzog das Papier sogleich mit weißem Mycel, welches sich von hier aus als schwimmende Decke auf dem Wasserspiegel vorschob. Submers flutete an dem Papier nach ca. 3 Wochen ein zarter Hyphenschleier. Das Luftmycel bildete nur an der Oberfläche des Papiers und der Lösung eine dickere Decke und gedieh am üppigsten am Papier in der Niveauhöhe. Inzwischen hatten sich überall an der Luft Konidienträger gebildet, so daß nach ca. 1 Monat ein grauer Sammet das Papier und einen Teil des Wasserspiegels bedeckte. Nach 3 Monaten Pilzwachstums war das Papier in der Niveauregion stark durchscheinend und glasig geworden. Zum Unterschied von anderen Pilzen waren hier auch in der Lösung von dem Zellulosestreifen aus lange, flutende Hyphen vorgewachsen. Daher wurde hier auch dessen unteres, eintauchendes Ende stark durchscheinend und schließlich glasig.

Die mikroskopische Untersuchung zeigte eine starke Zersetzung der Zellulosefasern. Die Membranfibrillen waren vielfach gelöst. An anderen Stellen bildeten sie einen lockeren Verband, welcher die ehemalige Zellform nur noch vereinzelt erkennen ließ, oder sie

lagen vollkommen isoliert als lange, fädige und spindelförmige Gebilde zwischen den Pilzhyphen.

Zusatz von Glukose (z. B. 0,25 %) bewirkte kein intensiveres vegetatives Wachstum als in der Vergleichskultur (ohne Glukose), jedoch wurden bedeutend reichlicher Konidien gebildet. Der Angriff auf die Zellulose ging in beiden Parallelkulturen in derselben Weise von statten und zeigte sich in einem gleichmäßigen Erweichen des Papieres, welches die Folge der Auflösung der Zellulosefasern war. Besonders starke Angriffe in der Niveauregion erfolgten auch hier nicht.

Penicillium II gedieh in allen Fließpapierkulturen gut. Es überzog das ganze Papier an der Luft und submers mit weißem Mycel. Am Luftmycel wurden schon nach kurzer Zeit reichlich Konidienträger gebildet, die zu säulenartigen Koremien vereinigt waren und gelblich grüne Konidien trugen. Bald hatten die Hyphen, was bei anderen Penicillien schon öfters beobachtet ist, an der Luft Farbstoffe gebildet und abgesondert, die in einigen Fällen gelb, in anderen auch orange bezw. rot waren. Diese gingen in Lösung über, so daß nach 2monatlicher Kultur die Flüssigkeit gelblich bezw. orange gefärbt war.

In allen Kulturen, wo Zellulose die einzige C-Verbindung war, zeigte die Faser starke Korrosionen. Bei geringem Glukosezusatz waren Pilzwachstum und Zelluloselösung etwas kräftiger wie in der Parallelkultur ohne lösliche C-Verbindung. In Nährlösung mit 6 % Glukosegehalt war das Wachstum sehr üppig, jedoch war hier (nach 4monatlicher Kultur) nicht die geringste Korrosion der Zellulose erfolgt.

Abweichend von den beiden ersten Spezies derselben Gattung verhielt sich *Penicillium III*. Die Sporen gelangten zur Keimung; es konnten sich jedoch keine kräftigen Mycelien entwickeln. Da alle anderen für das Wachstum notwendigen chemischen Elemente in genügender Menge und geeigneter Form vorhanden waren, mußte der Kohlenstoff der Zellulose der nicht-ausnutzbare Stoff sein. Dieser Schluß erfuhr seine Bestätigung durch das Verhalten des Pilzes in der Parallelkultur, die sich nur durch einen geringen Glukosezusatz unterschied. Hier zeigte der Pilz eine gute Entwicklung, bildete ein kräftiges Mycel und trieb reichlich Konidien. Nach einiger Zeit hörte die Entwicklung in der Kultur auf. Da die meisten der oben beschriebenen Pilze bei gleicher oder sogar

stärkerer Wachstumsenergie zu dieser Zeit noch weiter wuchsen, konnte Mineralstoffmangel kein Grund des Stillstandes sein. Offenbar war die Glukose nun verbraucht, und der Pilz vermochte auch in erstarktem, lebenskräftigem Zustande die Zellulose nicht in seinen Stoffwechsel hereinzureißen; er konnte kein zelluloselösendes Enzym ausscheiden.

Nachdem das Mycel viele Monate mit der Zellulosefaser in Berührung gewesen war, war diese in allen Fällen noch vollkommen intakt und unverletzt.

Einen weiteren Beleg dafür, daß sehr nahe verwandte Formen sich im Hinblick auf unsere Frage verschieden verhalten können, zeigt eine weitere Spezies: *Penicillium IV.* Auch dieser Pilz keimte, bildete aber in Zellulosekulturen nur wenig Mycel (auf Kosten der Reservestoffe der Sporen), wohingegen er sich bei Zusatz von Glukose gut entwickeln konnte.

Die Faser blieb unverletzt. Also auch ihm muß im Gegensatz zu *P. I* und *II* das Zelluloselösungsvermögen abgesprochen werden.

Aspergillus I (niger) und *Aspergillus II (spec.)* verhielten sich annähernd gleich. In der Luft wurden am Papier so spärliche Hyphen gebildet, daß ihre Gegenwart nur aus den wenigen schwarzen resp. gelben Konidienköpfchen erschlossen werden konnte. Auf der Flüssigkeit entwickelten beide nur unbedeutende Hyphendecken mit kümmerlichen Konidienköpfchen. Eine Korrosion der Faser hatte selbst nach vielen Monaten nicht stattgefunden.

In den Kulturen mit Glukosezusatz entwickelten sich die Aspergillen sehr gut, aber sie vermochten auch hier nicht die Faserstoffe anzugreifen.

Pyronema confluens vermochte die Zellulose als einzige Kohlenstoffquelle nicht auszunutzen. Zwar entwickelte sich in der Luft ein wattiges Mycel, dies blieb aber nur sehr locker und zeigte auch erst nach längerer Zeit einige Disken. Eine Auflösung der Faser fand nicht statt.

Auf Kosten von Glukose und Asparagin entwickelte der Pilz außer dem oben beschriebenen wattigen Mycel, das hier jedoch üppiger war, noch eine dickere Myceldecke und auch submers verflochtenes Mycel. Die Zellulose griff der Pilz auch in keinem dieser Versuche an.

Die untersuchten Phycomyceten gelangten alle zur Keimung, zeigten sich dann aber unfähig, die Zellulose des Fließpapiers als C-Lieferer zu verwenden. In den Versuchen der Gruppe 1 und 2 entwickelten *Mucor I*, *Mucor II*, *Mucor III*, *Mucor spinosus* nur submers am festen Substrat zahllose vegetative Hyphen, die aber während mehrerer Monate nicht länger als ca. 1 mm wurden. *Rhizopus* sandte zwar außerdem auch von der Oberfläche der Nährlösung einige Hyphen in die Luft, welche dort einige Konidien bildeten, aber auch dieses Wachstum stand nach kurzer Zeit still und die Faser blieb intakt.

In den Versuchen der 3. Gruppe entwickelten die Pilze alle ein lockeres Luftmycel, das während kurzer Zeit zahlreiche Konidien bildete und dann ständig dichter wurde, wohingegen sie submers in der Regel keine Hyphen trieben. Nachdem die löslichen C-Verbindungen verzehrt waren, hörte die Entwicklung auf.

Die Kulturen zeigten also, daß alle diese Mucorineen ihr Wachstum eher einstellen, als daß sie Zellulose spalten.

β) Hydrozellulose aus Fließpapier.

Da wiederholt in der Literatur die Vermutung ausgesprochen worden ist, daß die „Hydrozellulose" mit den „Hemizellulosen" der Botaniker verwandt oder auch z. T. identisch sei[1]), war auch das Verhalten der Pilze gegenüber typischer Hydrozellulose zu untersuchen.

Zur Herstellung meiner Hydrozellulose benutzte ich eine kombinierte Methode, welche sich auf Experimentalergebnisse zahlreicher Chemiker aufbaut. Um nachher die etwaigen Wachstumserfolge vergleichen zu können, ging ich von der Hydratzellulose des Fließpapiers aus.

Schwedisches Filtrierpapier wurde zunächst mit Äther, Alkohol und dann (48 Stunden lang) mit 2 % Kalilauge bei 20° C extrahiert. Eine Probeuntersuchung zeigte, daß hiernach die zuvor auftretende geringe Oxyzellulosereaktion unterblieb. Nach gründlichem Auswaschen mit warmem, destilliertem Wasser wurden die Papierstreifen 48 Stunden mit 3 % H_2SO_4 zunächst bei Zimmertemperatur behandelt und dann 1 Stunde lang bei 2 Atm. Druck auf 150° C erwärmt. Nach Verdünnen auf das 3fache Volumen

1) Siehe Euler, Chemie der Pflanzenstoffe. — Schellenberg, a. a. O., S. (3).

der Flüssigkeit ließ ich die Streifen abtropfen und erwärmte sie mit der absorbierten verdünnten Säure noch ca. 1 Std. auf 60° C bis zur Lufttrockenheit. Die so entstandenen Präparate wurden längere Zeit mit warmem Wasser und Alkohol ausgewaschen und somit vollständig von den geringen Säureresten befreit.

Die mit den Fließpapierstreifen vorgegangenen Veränderungen waren augenscheinlich: Die vorher elastische Zellulose war nunmehr brüchig und mürbe geworden und ließ sich leicht zu Pulver zerstoßen. Eine Änderung der Membranstruktur zeigte sich jedoch bei mikroskopischen Untersuchungen nicht. Eine Blaufärbung der Faser durch Jodlösung trat nach dieser Umwandlung nicht mehr ein, dagegen mit Jodwasserstoff eine von ausgeschiedenem Jod herrührende braune Färbung, die beim Wässern schnell in blau überging und darauf verschwand. Methylenblau wurde etwas gespeichert. Fehlingsche Lösung wurde jetzt nach längerem Erwärmen stark reduziert. Dagegen unterblieb die Furfurolreaktion.

Alle diese Reaktionen sind charakteristisch für die Hydrozellulose.

Auf dem in Hydrozellulose verwandelten Fließpapier zeigten die untersuchten Pilze das gleiche Verhalten, wie auf dem als Hydratzellulose (s. o.) verwendeten; es ist daher überflüssig, auf die Einzelergebnisse näher einzugehen. *Stemphylium*, *Mycogone*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Botrytis*, *Cladosporium II*, *Penicillium I* und *II* gediehen kräftig und hatten schon nach wenigen Wochen den Zellulosestreifen am schnellsten in der Niveauregion glasig gemacht.

Die mikroskopische Untersuchung der Hydrozellulosefasern ergaben, daß auch hier der völligen Auflösung eine vorübergehende Zerspleißung in Fibrillen vorangegangen war. Somit liegt in der nach dem angegebenen Verfahren hergestellten Hydrozellulose sicherlich keine einheitliche Verbindung vor.

Die übrigen untersuchten Pilze: die beiden *Aspergillus*-Spezies, *Trichothecium*, *Pyronema* und Mucorineen entwickelten allesamt nur unbedeutende Mycelien oder gar nur vereinzelte Hyphen. Sie vermochten Hydrozellulose nicht als C-Quelle auszunützen. Die Fasern zeigten dementsprechend keinerlei Korrosionen.

γ) Ungereinigte Hydratzellulose als Pergamentpapier.

Das verwendete Pergamentpapier war stark verunreinigte Zellulose. In der Hauptsache bestand es aus Hydratzellulose

vom Schwalbeschen Typus 1. Es enthielt (wie die unten zitierten Reaktionen zeigen) jedoch auch beträchtliche Mengen von Oxyzellulose, daneben Spuren von anderen nicht näher bestimmten organischen Verunreinigungen.

Reaktionen: Fehlingsche Lösung wurde schon nach kurzem Erwärmen reduziert und gab schließlich einen starken Niederschlag von Cu_2O, Phenylhydrazin in essigsaurer Lösung gab Gelbfärbung. Methylenblau wurde gespeichert. $\frac{N}{10}$ KOH gab Gelbfärbung.

Die mikroskopische Untersuchung zeigte, daß das Papier zum größten Teil aus Holzschliff bestand, der jedoch weitgehend zermahlen, gebleicht und von „Holzstoff" befreit war. Daneben fanden sich auch Reste von Bastzellen (Leinen und Stroh) und von Baumwollfasern. Es lag also typisches Pergamin[1]) vor.

Auf dem Pergamin brachten es alle Pilze zu einer mehr oder minder guten Entwicklung. *Stemphylium, Mycogone, Stachybotrys* und *Penicillium I* zeigten von Beginn an ein kräftiges Wachstum, das auch hier wieder in der Nähe des Niveaus am üppigsten war.

Alle diese Formen bewirkten eine starke Auflösung der Zellulose, die in der Mittelregion sogar vollständig war.

Eine Reihe weiterer Formen: *Penicillium III, Trichothecium, Cladosporium, Aspergillus I (niger), Aspergillus II (spec.)* und die *Mucor*-Arten vermochten hier gleichfalls ihr Mycel eine Zeitlang weiter zu entwickeln und Konidien zu bilden. Nachdem jedoch die Pilze viele Monate lang mit dem Papier in Kontakt gewesen waren, konnte nicht die geringste Auflösung oder Korrosion der Faser festgestellt werden. Die Mycelentwicklung auch der letzteren Pilze, im Gegensatz zu ihrem Verhalten in den Kulturen mit reinem Fließpapier als einziger C-Quelle erklärt sich ungezwungen durch die im Pergamin vorhandenen Verunreinigungen. Nachdem diese, soweit sie aufnahmefähig waren, ausgenutzt worden, stellten die Pilze ihr Wachstum ein.

δ) Leinenfaser als Hydratzellulose.

Nahezu chemisch reine Hydratzellulose findet sich in den Membranen der Bastzellen von *Linum* vor, wie sie in der ge-

1) Siehe Müller, Herstellung des Papiers, S. 1442.

bleichten Leinwand des Handels enthalten sind. Durch die technischen Prozesse des „Röstens, Bäuchens, Bleichens“ sind die Fasern von allen Fremdstoffen befreit, haben aber ihre Membranstruktur bewahrt.

Für die vorliegenden Versuche wurden Fäden aus Leinwand durch Extrahieren mit Alkohol, Äther, verdünnter Schwefelsäure (2 %), Natronlauge (2 %) bei gewöhnlicher Temperatur gründlich gereinigt.

Die mikroskopische Untersuchung zeigte, daß die ungequollene Faser keine Membranstreifung erkennen ließ; nur an den von Höhnel zuerst beschriebenen „Verschiebungen“ oder „Knoten“ war beim Prozeß des „Brechens“ eine Lockerung der sonst nicht unterscheidbaren Membranfibrillen erfolgt.

Bei $^1/_2$stündigem Kochen mit Fehlingscher Lösung fand keine Reduktion statt. Neßlers Reagens bewirkte keine Dunkelfärbung. Phenylhydrazin in essigsaurer Lösung verursachte keine Gelbfärbung. Methylenblau wurde nicht gespeichert. Chlorzinkjod bewirkte eine tiefe Violettfärbung, welche gegen Auswaschen sehr beständig war. $\frac{N}{10}$ KOH färbte die Membran nicht gelb. Die Furfurolreaktion fiel negativ aus. Durch diese Untersuchung war erwiesen, daß die Membran frei von Hydro- und von Oxyzellulosen war und reine Hydratzellulose bei nur geringer Quellung darstellte.

Stemphylium nutzte die Zellulose der Leinfaser genau so aus, wie die des Fließpapiers. Allerdings wurde dieser Pilz nicht auf *Linum*-Zellulose als einziger C-Quelle kultiviert, sondern nur unter Hinzufügung von Glukose. Auf Kosten dieser entwickelte sich sofort ein kräftiges Mycel, das wie in obigen Kulturen im Niveau am üppigsten wurde, aber auch an den oberen in Luft befindlichen Fadenteilen gute Entwicklung zeigte.

Konidienbildung setzte schon nach wenigen Tagen ein. Die Glukose hinderte nicht die Auflösung der Zellulose, jedenfalls nicht auf die Dauer, denn schon nach ca. 1 Monat konnte man mit bloßem Auge an den Stellen lebhaftesten Pilzwachstums das Verschwinden der Faser beobachten. Nach ca. 3 Monaten war die Zellulose im Niveau vollkommen aufgezehrt, während sie von dort nach oben und unten im allmählichen Übergang alle Stadien der Faserauflösung zeigte (Taf. V, Fig. 3 *b*).

Bei Asparaginzusatz zeigte der Pilz abweichendes Verhalten: Nach anfänglich kümmerlicher Entwicklung brachte er es schließlich auch zu einem kräftigen Mycel, dies war jedoch nach 3 Monaten noch ausschließlich vegetativ. Die Zelluloselösung war nach dieser Zeit sehr ausgiebig, wenn auch nicht ganz so stark wie in glukosehaltiger Nährlösung.

Mycogone keimte sofort und bildete in der Nähe der Fäden längere Hyphen. Eine Bevorzugung der Niveauregion fand nicht statt, denn eine ausgesprochene Deckenbildung trat nicht ein. An den Fadenenden, die sich in der Luft befanden, bildeten sich jedoch nur wenige Hyphen aus. Nach 5 Wochen hatten sich die Fadenenden in der Lösung mit einem dichten Gewirr von stark verzweigten Hyphen umgeben, das über und über mit den tyyischen dunkelbraunen, meist am Ende kurzer Seitenäste sitzenden Konidien übersät war.

Nach $^1/_2$ Jahr war der Leinwandfaden in der Flüssigkeit bis auf die letzten Reste durch die Wirksamkeit des Pilzes aufgelöst, während das obere trockene Ende nur geringere Korrosion, Hervortreten der Fibrillenstreifung zeigte. In der mittleren Region konnten die verschiedensten Übergangsstadien nachgewiesen werden (Taf. V, Fig. 4 *a—d*).

Bei Zusatz anderer Nährstoffe zeigte *Mycogone* verändertes Verhalten. Mit Glukose fand schnelleres Wachstum als gewöhnlich statt, dann erfolgte auch ausgiebige Zelluloselösung. In der Parallelkultur mit Asparaginzusatz fand anfänglich ein sehr langsames Wachstum und eine starke Hemmung in der Konidienbildung statt. Selbst nach 5 Monaten war das Mycel fast ganz vegetativ geblieben. Die sehr wenigen dunklen Konidien waren erst nach ca. 4 Monaten gebildet worden, wahrscheinlich nach der völligen Absorption des Asparagins.

Stachybotrys. Die Sporen keimten in 3 Tagen und entwickelten submers schneller als bei den vorigen Pilzen äußerst zarte Hyphen, die, anscheinend aerotropisch gereizt, vom Faden aus vertikal nach oben zum Niveau der Nährlösung wuchsen. An der Luft entwickelten sich die vegetativen Hyphen nur an den feuchtesten Stellen, d. h. in der Nähe der Niveaus. Nur dort entstanden auch die dunklen charakteristischen wickelähnlichen Konidienträger.

Der Angriff auf die Faser erfolgte zunächst in der Nähe der Oberfläche, dann auch, aber langsamer, in der Lösung. Da die

Hyphen dieses Pilzes besonders zart sind und submers keine dunklen Sporen bilden, war der Mycelzylinder, der an Stelle des Leinwandfadens entstanden war, gerade bei diesem Pilz ganz glasig und durchsichtig, und man konnte die letzten Reste der Bastfasern unter dem Mikroskop besonders deutlich darin liegen sehen. Messungen an diesen zeigten, daß die inneren Zellwandschichten viel schneller der Auflösung erlegen sind wie die äußeren[1]). Dies deutet auf eine leichtere Hydrolysierbarkeit jener jüngsten Schichten durch das Pilzenzym hin.

Bei Zusatz von Glukose und von Asparagin fand Wachstum und Auflösung der Zellulose statt, jedoch in beiden Fällen nur geringe Konidienbildung. Asparaginsusatz verlangsamte die Zelluloselösung.

Trichoderma. Die Sporen keimten sofort. Nach wenigen Tagen waren überall am Faden, sowohl in der Flüssigkeit als auch an der Luft, zarte Hyphen zu beobachten. Nach wenigen Wochen traten an der Luft die typischen Konidienpolster auf, zunächst weiß, dann gelblich werdend, schließlich grün. Nach einem Monat war der ganze Faden von dichtem Hyphengewirr umzogen; submers flottierten daran teilweise sehr lange Hyphen.

Nach 4 Monaten wurde die Kultur mikroskopisch untersucht. Die Faser war an den Stellen des starken Pilzwachstums vollkommen verschwunden. An ihrer Stelle fand sich ein kräftiges Hyphengeflecht, dessen lange, zylindrische Form (Durchmesser $1^1/_2$ mm) andeutete, wo sich ehemals der Leinwandfaden befunden hatte. Beim Verfolgen des Pilzmycels nach dem Orte geringeren Wachstums am oberen trockenen Fadenende zeigten sich auch hier in demselben allmählich ineinander übergehend alle Stadien der Wirksamkeit des Pilzes (Taf. V, Fig. 5 *b*—*d*).

In der Asparaginzellulosekultur zeigte auch *Trichoderma* wie *Mycogone* (s. o.) abweichendes Verhalten. Der Pilz wurde sichtlich in seinem Gedeihen gehindert und entwickelte sich bedeutend schlechter wie bei Glukosezusatz. Der Pilz, der sonst schon nach kürzester Zeit charakteristisch gefärbte Konidienkissen bildet, hatte hier nach 5 Monaten nur vegetative Hyphen entwickelt. In beiden Parallelkulturen war nach dieser Zeit die Zellulose des Fadens stark angegriffen. In der Niveauregion, wo bei Glukosezusatz eine dicke, schwimmende Decke mit reichlichen Konidienkissen ent-

1) Siehe Haberlandt und Zuntz, a. a. O., S. 704 ff.

standen war, war die Zellulose vollkommen gelöst worden und von dem eintauchenden Ende waren nur Spuren zurückgeblieben.

Das Wachstum von *Botrytis* konnte in der Versuchsreihe ohne lösliche C-Verbindungen leider nicht in der Niveauregion beobachtet werden, da der Leinwandfaden ganz in der Lösung versank. Die Konidien keimten, entwickelten submers aber nur wenig Mycelflocken. In der Nähe dieser fand eine nur geringe Aufspleißung der Zellwände in Fibrillen statt. Die Hyphen wuchsen nicht bis zum Niveau. Bei Glukosezusatz fand kräftigeres Wachstum statt. Eine oberflächlich schwimmende Myceldecke entwickelte reichliche Luftkonidien. Beim Sinken des Spiegels blieb diese Decke am Glas hängen und entwickelte reichlich Sklerotien, die flach waren, sich aber weit ausdehnten und oberflächlich dunkelbraun färbten. Submers waren nur am Faden Hyphen vorhanden.

Eine Korrosion der Fasern war submers und hauptsächlich bei dem kräftigen Pilzwachstum in der Niveauregion zu erkennen. In letzterer war der Faden so stark erweicht, daß er bei geringem Schütteln durch den Zug des unteren Endes zerriß. Die mikroskopische Untersuchung zeigte starke Auflösung der Zellulose: die Fibrillen waren nur zum Teil noch erhalten geblieben.

Durch Asparagin scheint auch dieser Pilz in seinem Wachstum direkt gehemmt zu werden. An der Leinenfaser waren nach längerer Zeit in der Luft und submers nur kürzere Hyphen entwickelt. Der Angriff auf die Faser war bedeutend geringer als in den Glukosekulturen, jedoch war auch hier eine Auflockerung und teilweise Aufspleißung erfolgt.

Trichothecium keimte, entwickelte aber nur ein unbedeutendes Mycel, das auch nur wenig Konidien bildete. Ein Angriff auf die Leinenfaser erfolgte nicht. Bei Gegenwart von Glukose und von Asparagin zeigt der Pilz gutes Fortkommen und reichliche Konidienbildung. Auflösung der Zellulose fand aber auch hier nicht statt.

Die Sporen von *Cladosporium I* keimten und bildeten kurze, zarte Hyphen. Diese konnten jedoch aus Nährstoffmangel nicht weiter wachsen und gingen vollkommen in der Bildung von Gemmen auf.

Ein Angriff auf die Zellulose ist nicht erfolgt, denn die Fasern sind nach ca. 7 Monaten vollkommen erhalten.

Bei Zusatz von Glukose erfolgte kräftiges Wachstum, aber keine Auflösung des Fadens. Bei Asparaginzusatz blieb der Faden gleichfalls gut erhalten.

Cladosporium II entwickelte zwar im ganzen nur wenig lokalisierte Mycelien an dem in der Luft befindlichen Ende des Fadens; wo diese aufsaßen, zeigte sich jedoch unter dem Mikroskop eine starke Auflösung der Zellulose (Taf. V, Fig. 6). Submers entwickelten sich nur längere braune Hyphen. Bei Glukosezusatz bildete der Pilz eine dunkelbraune, oberseits schwimmende Mycelhaut und submers kräftige Hyphen; bei Asparaginzusatz war das Wachstum etwas schwächer. In beiden Fällen wurden die Fasern stark korrodiert.

Penicillium I hatte die einzelnen Fasern mit Hyphen umsponnen. Die Korrosion der Faser war wie bei *Cladosporium II*.

Kräftiger war die Zelluloselösung, wenn der Pilz auf Kosten von Glukose schnell erstarkte und eine Haut bildete, welche schon nach weniger als 10 Tagen reichlich graue Konidien trieb. Submers waren zu dieser Zeit erst spärliche Hyphen am Faden ausgebildet, aber beim Verbrauch der immerhin geringen Zuckermenge wurden auch diese kräftiger und griffen die Zellulose energisch an. In der Niveauregion erfolgte die kräftigste Lösung, aber auch submers blieb nicht viel von der Zellulosefaser zurück, wie die mikroskopische Untersuchung nach 5monatlicher Kultur zeigte. In der Asparaginkultur wuchs *P.* schlechter und ausschließlich vegetativ. Die Faser war mittelmäßig angegriffen.

Penicillium II. Die Sporen keimten nach wenigen Tagen sowohl in der Luft als auch in der Lösung, das Wachstum schritt dann in der Luft nur langsam, submers besser fort. Nach ca. 14 Tagen konnten an der Luft die ersten Koremien und Konidien beobachtet werden. Die mikroskopische Untersuchung des Fadens zeigte eine Korrosion der Faser, die aber bei dem bescheideneren Pilzwachstum nur eine teilweise war.

Bei Glukosegehalt der Nährlösung entwickelte sich auch dieser Pilz sogleich sehr üppig und bildete reichlich Konidien. Dem kräftigen Wachstum entsprechend fand eine starke Zelluloselösung statt, die in der Niveauregion wiederum zu vollkommener Auflösung führte. Im Gegensatz dazu hatte Asparagingehalt der Nährlösung wieder bescheidenes Wachstum des Pilzes und nur geringe Konidienbildung zur Folge. Selbst nach 3 Monaten war hier nur eine geringe Korrosion der Faser erfolgt.

Penicillium III keimte auch, vermochte jedoch nur ein spärliches Mycel zu entwickeln, das nicht einmal Konidien entwickelte. Ein Angriff auf die Faser war nicht erfolgt.

Aspergillus niger griff die Zellulose der Leinfaser ebenfalls nicht an, und zwar auch nicht bei Glukosezusatz, wobei der Pilz sehr kräftig gedieh.

Aspergillus II gedieh nicht. Nur wenige Hyphen entwickelten sich an der Oberfläche der Nährlösung und bildeten wenige kümmerliche Konidienträger. Die Zellulose der Faser blieb völlig intakt.

Bei Glukosezusatz wuchs der Pilz gut und fruktifizierte reichlich, hatte aber nach 4 Monaten die Fasern noch nicht korrodiert.

Pyronema wurde nur auf glukosehaltiger Nährlösung gezogen. Hier entwickelte sich auf der Oberfläche schnell ein lockeres Hyphengeflecht. In der Lösung wurde nur flockiges Mycel gebildet. Obschon der Pilz auf Kosten der Glukose sich so gut entwickelt hatte, ließ er die Faser völlig intakt.

Auf ihr Wachstum in der Kultur ohne Zusatz löslicher C-Verbindungen wurde von den Phycomyceten nur *Mucor spinosus A* untersucht. Dieser Pilz keimte mit kurzen Hyphen aus, vermochte aber weder sich weiter zu entwickeln noch Auflösungserscheinungen an der Zellulosefaser zu bewirken.

Auf Kosten der Glukose entwickelten sich die untersuchten Mucorineen gut, mit Ausnahme von *Mucor I* und *II*, welche nicht keimten. Die anderen: *Mucor III*, *Mucor spinosus A*, *Mucor spinosus B* und *Rhizopus* bildeten reichlich Luftmycel mit Konidien von einer oberflächlich schwimmenden Hyphendecke aus, dazu submers flutende Hyphen am Faden und am Glasrand.

Trotz dieses guten Wachstums griff keiner der Pilze die Zellulose der Faser an, sie stellten vielmehr alle nach Aufzehrung des Traubenzuckers ihr Wachstum ein.

Asparagin wurde von den untersuchten Formen *(Rhizopus* und *Mucor spinosus)* auch gut ausgenutzt. Sie entwickelten Luftmycel mit Konidien und submers flutende Hyphen am festen Substrat; eine Korrosion der glatten Faseroberfläche fand jedoch nicht statt.

ε) Oxyzellulose aus Leinfaser.

Die Oxyzellulose stellte ich nach dem von Witz zuerst angegebenen Verfahren her: Leinwandfäden wurden in Lösung von Chlorkalk getaucht und darauf 2 Monate lang staubsicher in der Luft aufgehängt. Nach dieser Zeit waren die Fäden leicht zerbrechlich und mürbe geworden, so daß sie sich durch Zerdrücken

in Pulver verwandeln ließen. Die Fäden wurden vorsichtig gereinigt: zunächst in Wasser, dann $^1/_2$ Std. lang in $1^1/_2$ % Salpetersäure, darauf $^1/_4$ Std. in 1 % warmer Bisulfitlösung, $^1/_4$ Std. in 1 % Salzsäure und schließlich längere Zeit in warmem Wasser ausgewaschen.

Die Prüfung auf Oxyzellulose erfolgte durch folgende Reaktionen: Fehlingsche Lösung wurde stark reduziert. Phenylhydrazin in essigsaurer Lösung gab eine gelbe Färbung, welche gegen Alkohol beständig war. Methylenblau wurde sehr kräftig gespeichert. $\frac{N}{10}$ NaOH-Lösung färbte die Fäden in der Kälte gelb und beim Kochen braun. In Alkali (12 % KOH) löste sich der größte Teil der Substanz, ließ sich jedoch durch Säure (verd. HCl) in Flockenform wieder ausfällen. Der ungelöste Rest betrug räumlich ca. $^1/_3$. In Kupferoxydammoniak löste sich der Faden vollkommen auf.

Diese Reaktionen erweisen einen sehr großen Gehalt des Präparats an Oxyzellulose. Der in Alkali unlösliche Rückstand, d. h. die sogenannte „α-Oxyzellulose“ Nastukoffs, ist meines Erachtens nach unseren heutigen Kenntnissen mit großer Wahrscheinlichkeit hauptsächlich als Rest der unveränderten (Hydrat)-Zellulose anzusprechen. Dieser Rest widerstandsfähiger Substanz hatte für die Methodik des Versuches den Vorteil, daß er die Festigkeit der Leinwandfäden erhöhte. Da er anderseits keine Störung in den Versuchen hervorrufen konnte, zog ich es vor, die nach dem Witzschen Verfahren gewonnene Oxyzellulose zu verwenden und nicht die nach Nastukoff u. a. mittels Permanganat oder mittels Salpetersäure und anderen Reagentien dargestellten Präparate, welche zwar einen größeren Gehalt an β- und γ-Oxyzellulose aufweisen, aber auch keine reinen Präparate sind; andererseits würden sie wegen ihrer großen Brüchigkeit die Versuche stark stören.

Die nach dem oben beschriebenen Verfahren behandelten und gereinigten Leinwandfäden, welche, wie wir sahen, aus oxydierter Zellulose bestanden, wurden in Reagenzröhren mit den Lösungen, wie in voriger Versuchsgruppe, am Glasrand befestigt.

Der Vergleich der einander entsprechenden Kulturen bei den Leinfaser-Versuchen zeigte, daß die Pilze in beiden Versuchsreihen sich völlig analog verhalten haben. Damit ist erwiesen, daß die Pilze die relativ leicht lösliche Oxyzellulose in einem Falle

genau so auflösen, wie die resistentere Hydratzellulose und im anderen Falle die erstere ebensowenig auszunutzen vermögen wie die letztere (s. Taf. V, Fig. 5 u. 6).

Nach Erwägungen, die sich hauptsächlich auf die chemischen Eigenschaften der Oxyzellulosen beziehen, hätte man wohl erwarten können, daß mindestens dieser oder jener Pilz, welcher sich gegen Hydratzellulose passiv verhält, doch die Oxyzellulose auszunutzen vermocht hätte. Das Ergebnis der biologischen Versuche belehrt uns eines anderen.

Dies läßt einen Schluß auf die Wirksamkeit der zellulose-lösenden Enzyme zu. Nehmen wir die E. Fischersche Enzymtheorie als zu Recht bestehend an, so können wir folgern, daß die mehr minder hypothetische Zellulase auf die chemischen Gruppen spaltend wirkt, die der Oxyzellulose und der Hydratzellulose gemeinsam sind.

ζ) Gemischte Zellulose der Baumwollfaser.

Die Zellulose, wie sie in den Samenhaaren der Baumwolle vorkommt, wurde in Form käuflicher Verbandwatte verwendet.

Diese bestand nach der mikroskopischen Untersuchung aus Fäden verschiedener Dicke und Länge, welche nur wenig natürliche Enden aufwiesen. Die Fasern waren meist dünnwandige, flachgedrückte und gedrehte Schläuche. Kutikula und Porenkanäle waren nicht vorhanden, dagegen wies die Membran eine schwache Wandstreifung auf, die schraubig um die Faser verlief, und an den breitgedrückten Stellen oft eine gitterförmige Streifung vortäuschte.

Da die Verbandwatte einen energischen technischen „Reinigungs"-Prozeß durchmacht, mußte der chemischen Untersuchung besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden. So wird z. B. bei der Bleiche die Baumwolle manchmal zu kräftig mit Hypochloriden behandelt, wobei dann leicht Oxyzellulosen entstehen. Vielfach findet auch eine alkalische Abkochung, Behandlung mit Wasserstoffsuperoxyd und anderen Stoffen statt. Durch viele dieser üblichen Manipulationen kann die natürliche Zellulose mancherlei Veränderung erleiden.

Daß eine solche in der verwendeten Baumwollfaser tatsächlich bewirkt war, zeigten die angestellten Reaktionen: Reduktionsvermögen der Faser war vorhanden, denn ca. $^1/_4$stündiges Kochen

mit Fehlingscher Lösung ergab einen starken roten Bodensatz. Dieser konnte von Hydro- oder von Oxyzellulose herrühren. Jodkalium gab eine kaum merkliche Blaufärbung, die mit Wasser wieder verschwand, und mit Phenylhydrazin entstand ein gelbbraunes Hydrazon. Da die Furfurolreaktion eintrat, $\frac{N}{10}$ KOH eine Gelbfärbung bewirkte und Methylenblau gespeichert wurde, war gezeigt, daß Oxyzellulose in der Faser zugegen war. Die gleichzeitige Gegenwart von Hydrozellulöse war durch die Phenylhydrazinreaktion wahrscheinlich geworden.

Von der Watte wurden Flocken von ca. $2^1/_2$ cm Durchmesser in Reagenzröhren getan, die mit Nährlösung bis zu 6—7 cm hoch gefüllt waren.

In den Kulturen war ein Teil der Pilze zu keinem oder nur zu sehr kümmerlichem Wachstum fähig. Dies waren in Übereinstimmung mit den anderen Versuchen: *Trichothecium*, *Cladosporium I*, *Penicillium III*, *Aspergillus* und die Phycomyceten. Eine gewisse Abweichung von seinem sonstigen Verhalten zeigte in diesen Kulturen *Pyronema;* denn es zeigte eine im ersten Augenblick nicht zu erklärende Mycelentwicklung und Fruktifikation. Welche Stoffe dies ermöglicht haben, konnte nicht einwandfrei festgestellt werden; mir ist aber nicht unwahrscheinlich, daß bei der Sterilisation der Watte mit trockener, heißer Luft aus den Zellulosederivaten unbekannte Stoffe entstanden sind, welche auf natürlichen Standorten dieses Pilzes, d. i. auf Brandstätten, auch infolge der Hitze reichlicher auftreten. Die unveränderte Zellulose wurde auch hier nicht in den Stoffwechsel hereingezogen.

Bei mikroskopischer Untersuchung der Fasern aus den 4 Monate alten Kulturen zeigten dieselben in allen diesen Pilzkulturen keinen Unterschied gegenüber denen der unbeimpften Kontrollkultur.

Anders verhielten sich die Fasern in den Kulturen mit intensivem Pilzwachstum.

Mycogone hatte nach ca. 3 Monaten die ganze Flocke gelöst.

Stachybotrys war ebenso üppig gewachsen, jedoch ließen sich oberhalb des durch Verdunsten der Flüssigkeit gesunkenen Niveaus am Glasrande noch einige Faserreste finden, welche Übergangsstadien bei der Zelluloseauflösung darstellten (Taf. V, Fig. 7). Danach war zunächst durch das Pilzwachstum die schon oben er-

wähnte Spiralstreifung deutlicher geworden. Mit dem Fortschreiten der Auflösung blieben endlich nur verschieden lange, spindelförmige Membranfibrillen übrig, die frei oder zu lockeren Verbänden vereinigt waren und nur noch durch ihre Lagerung die ehemalige Spiralstreifung der ganzen Membran erkennen ließen.

Solche Korrosionen zeigten auch Faserreste aus den Kulturen von *Trichoderma* und *Penicillium II*, sie waren hier sogar häufiger, da die Wachstumsenergie dieser Formen geringer ist, als die der vorgenannten.

η) Zellulosegallerte (Gel).

Um die Gallerte herzustellen, fand nach dem Erproben mehrerer Literaturangaben schließlich das folgende Verfahren Anwendung: Es wurde Watte in Kupferoxydammoniak gelöst und die Flüssigkeit durch Glaswolle filtriert. Nach Verdünnen mit Wasser, dem wenig Salzsäure zugesetzt war, flockte die Zellulose aus. Darauf erfolgte gründliches Auswaschen mit warmem Wasser, um vor allen Dingen auch die letzten Reste des gelösten Kupfersalzes zu entfernen. Die Flocken sind als Hydratzellulose vom Schwalbeschen Typus 4 anzusprechen.

Die Untersuchung zeigte, daß dieser Zellulosegallerte kein Reduktionsvermögen zukommt, denn beim Kochen mit Fehlingscher Lösung entstand kein Niederschlag, es trat nur ein äußerst zarter, gelblicher Farbenton, wohl auf Kosten von Verunreinigungen, auf. Mit Phenylhydrazin zeigte sich keine Färbung, ebensowenig mit $\frac{N}{10}$ KOH. Methylenblau wurde nicht gespeichert. Dagegen wurde Congorot von der Gallerte aufgenommen. Chlorzinkjod bewirkte eine recht beständige, tief blauviolette Färbung, wohingegen mit Jodkalium allein keine Blaufärbung konstatiert werden konnte. Die Furfurolreaktion trat nicht ein.

Aus diesen Reaktionen ergibt sich, daß wir die Zellulosegallerte auf keinen Fall als Hydrozellulose auffassen können, wie dies in älteren chemischen Arbeiten mehrfach geschehen ist, und daß auch andererseits keine Oxyzellulose in nachweisbaren Mengen vorhanden war.

Die von der Lösung abgeschiedene und gründlich ausgewachsene, flockige Zellulose wurde den Pilzen in Nährlösung dargeboten. In einigen Versuchsreihen wurde der so entstandene Zellulosebrei in Reagenzröhren gegossen und nach gründlichem Sterilisieren be-

impft. Da die Zelluloseflocken allmählich zu Boden sanken, wurden die Kulturen von Zeit zu Zeit aufgeschüttelt, damit die sich in der Hauptsache im Niveau entwickelnden Mycelien auch in ihrer Nähe Zellulose vorfänden. In anderen Versuchen wurde der Brei in flache Petrischalen gegossen, welche nach dem Beimpfen in große, feuchte Kammern gestellt wurden, damit Austrocknen und Verunreinigung der Kulturen möglichst vermieden wurde. Diese Kulturen wurden nur 6 Wochen lang erhalten.

Die Versuche ergaben, daß die gallertige Zellulose ein günstiger Nährstoff für viele Pilze ist. In allen Kulturen war die Parallelität der kräftigen Mycelentwicklung einerseits und des Klarwerdens der Lösung andererseits offenkundig.

Stemphylium, *Mycogone*, *Trichoderma* und *Penicillium II* hatten nach 6 Monaten (z. T. auch schon nach kürzerer Zeit) die Zellulose vollkommen verarbeitet, während *Stachybotrys*, *Botrytis*, *Penicillium I*, *Cladosporium II* nur noch ganz minimale Reste zurückgelassen hatten.

Trichothecium, *Cladosporium I*, *Penicillium III*, *Aspergillus I* und *II* sowie *Pyronema* und alle Phycomyceten hatten keine Abnahme des Zellulosebreies bewirkt.

Aus den Versuchen resultiert, daß die Pilze, welche die oben verwendeten Zellulosen korrodiert und aufgelöst hatten, auch auf Kosten dieser Zellulose gediehen, daß jedoch die dazu unfähigen auch das Gel als C-Quelle nicht auszunutzen vermochten.

b) Natürliche echte Zellulosen.

α) Lindenbast.

Um mechanisch völlig unveränderte und doch möglichst reine natürliche Zellulosefaser zu benutzen, verschaffte ich mir Lindenbast. Im Herbst wurde ein ca. 10—12jähriger Zweig von *Tilia* abgeschnitten. Die primäre Rinde wurde entfernt und darauf die sekundäre Rinde, welche ca. $1^1/_2$ mm stark war, abgezogen. Diese wurde in Bänder von 2 mm Breite und 2 cm Länge geschnitten.

Der Querschnitt der Bänder zeigte ca. 10 tangentiale Bastschichten, welche mit Leptombinden alternierten und in radiärer Richtung von 5—7 Markstrahlen durchbrochen wurden, die sich nach außen etwa keilförmig erweiterten.

Der Inhalt aller Zellelemente des Bastbandes wurde entfernt durch ca. 3monatliche Behandlung bei Zimmertemperatur mit schwachem Eau de Javelle, das zeitweilig erneuert wurde. Darauf erfolgte gründliches Auswaschen mit Wasser, Alkohol und Äther.

Die Untersuchung des Bastes ergab, daß die Zellulose der Fasern durch diese Behandlung nicht verändert worden war. Sie war weder brüchig noch zerreiblich geworden, auch wurde Methylenblau nach der Behandlung ebensowenig gespeichert wie vorher. Eine Membranstreifung war nicht zu erkennen.

Die beschriebenen Baststreifen wurden in Reagenzröhren mit Nährlösung getan, worin sie ganz untertauchten.

Stemphylium hatte schon nach wenigen Tagen das Bastband mit einem dichten, hyalinen Hyphenpelz umgeben. Die Hyphen wurden länger und erstreckten sich nach oben, wo sie eine lockere, bald aber sehr dicht werdende Haut bildeten. Diese nahm nach kurzem eine schwarze, von den reichlich gebildeten Konidien herrührende Farbe an.

Nachdem der Pilz 2 Monate lang in der Kultur gediehen war, wurde der Baststreifen mikroskopisch untersucht. Es waren mit ihm bedeutende Veränderungen vor sich gegangen. Zunächst waren die Mittellamellen (Interzellularsubstanz) stark verquollen und z. T. in Lösung gegangen, denn ein Teil der Bastfasern lag völlig isoliert neben dem dicken Bastband. Die übrigen Fasern des Bandes waren auch nur noch in lockerem Verbande und ließen sich sehr leicht mit den Präpariernadeln auseinander ziehen.

Die Bastfasern selbst waren stark korrodiert und boten an den Korrosionsstellen interessante Aufschlüsse über den Membranbau.

Während an den Fasern aus der unbeimpften Parallelkultur die Membran durch und durch homogen war, und ein schiefer Verlauf der Fibrillen nur aus der Richtung der spaltenförmigen Tüpfel gefolgert werden konnte, hatte das Pilzwachstum ein deutliches Hervortreten der Fibrillarstreifung in der Membran bewirkt (Taf. V, Fig. 8). Des weiteren hatte die Wirkung an den spaltenförmigen Tüpfeln energisch eingesetzt. Ihr Querschnitt war erweitert worden und zwar von außen nach innen; denn es waren trichterähnliche Gruben entstanden, welche selbst wiederum an ihrer Begrenzungsfläche mannigfache Unebenheiten zeigten.

Bei tiefer Einstellung des Mikroskops war die Spaltenform der Tüpfel noch deutlich zu erkennen, aber die Begrenzungslinie war nicht mehr glatt, sondern zickzackförmig.

In den äußersten Schichten (d. h. bei hoher Einstellung) war die ehemalige Spaltenform nur noch in wenigen Fällen erkennbar. Wie die Fig. 8 *d*, Taf. V zeigt, waren vielfältig gezackte, unregelmäßig sternförmige Figuren entstanden, indem auch senkrecht und schräg zur ursprünglichen Spaltenrichtung Korrosionskanäle und Gruben gebildet wurden. Offenbar erlag die Fibrillenkittsubstanz zuerst dem Angriff; daß aber aber schon bald danach eine Auflösung der Fibrillen erfolgt war, geht daraus hervor, daß diese nicht isoliert vorgefunden wurden.

Die Korrosionserscheinungen, die Haberlandt an den Libriformfasern des Birkenholzes, welche den Verdauungskanal des Schafes passiert hatten, beobachtete, zeigen mit der hier beschriebenen eine große Ähnlichkeit. Auch Haberlandt unterscheidet danach in den verdickten Zellwänden resistentere Fibrillen und eine leichter lösliche Kittsubstanz.

An den Tüpfeln und ihrer Umgebung war die Auflösung bedeutend stärker erfolgt, als an den anderen Stellen. Ob diese Verschiedenheit auf chemische oder physikalische Unterschiede der Membranbestandteile zurückzuführen ist, oder ob sie auf Unterschieden in der Strömungsgeschwindigkeit der umgebenden Flüssigkeit beruht, soll hier nicht entschieden werden.

Mycogone hatte die Baststreifen ebenso schnell wie *Stemphylium* mit kräftigem Mycel umgeben, das von den zahlreich entstandenen Konidien ganz dunkel gefärbt worden war. Schon nach 1 Monat war das ziemlich dicke, ehemals feste Bastband in seinem Hyphengeflecht vollkommen weich geworden. Nach 2 Monaten wurde die Kultur untersucht, und es zeigte sich, daß die Verdickungsschichten der Zellwände vollkommen in Lösung gegangen waren.

Stachybotrys bildete bald einen äußerst zarten, durchsichtigen, submersen Mycelschleier aus langen, weißen Hyphen, der am Wasserspiegel wenige Konidienträger bildete. Das Mycel hüllte dann den Baststreifen vollkommen ein, aber man konnte dessen Umrisse noch deutlich hindurchschimmern sehen.

Nach 6monatlicher Kultur ergab die Untersuchung, daß die Zellulose und die gesamten anderen Membranbestandteile vollkommen in Lösung gegangen waren. In der Hauptsache waren die Hyphen in der ehemaligen Richtung der Bastfasern gewachsen: offenbar hatte ihnen anfänglich das Medium hier die wenigsten

Widerstände entgegengesetzt, d. h. es waren die Mittellamellen zuerst gelöst worden.

Die Untersuchung der Nährlösung mit Fehlingscher Lösung ergab, daß keine reduzierenden Stoffe vorhanden waren, also auch der gesamte Zucker, der bei der Lösung der Zellulose entstanden war, vom Pilz ausgenutzt wurde.

Trichoderma. Zahlreiche lange Hyphen entstanden bald in der Umgebung des Bastbandes; sie bildeten dann eine oberflächlich schwimmende Hyphendecke und auf dieser nach ca. 3 Wochen Konidien.

An den 5 Monate alten Kulturen zeigte die mikroskopische Untersuchung, daß die Zellulose der Bastfasern und der benachbarten Markstrahlzellen vollkommen in Lösung gegangen war. Dagegen hatten die Mittellamellen in diesem Falle der Auflösung Widerstand geleistet. Sie ließen an vielen Stellen noch deutlich die Form der ehemals zwischen ihnen liegenden Zellen erkennen. Zellulosereaktionen gaben diese Reste nicht.

Trichothecium. Die Sporen keimten, aber entwickelten nur sehr kurze Hyphen. Nach 6 Monaten zeigte die mikroskopische Untersuchung, daß kein Angriff auf die Zellulose erfolgt war.

Cladosporium II. Reichliches dunkles Mycel hatte nach wenigen Wochen den ganzen Baststreifen eingehüllt. Bei mikroskopischer Untersuchung der 6 Monate alten Kultur fanden sich sowohl von der Zellulose als auch von den Mittellamellen keine Spuren mehr. Die Hyphen waren hier, wie auch bei *Stachybotrys*, hauptsächlich in der Längsrichtung der ehemaligen Bastfasern gestreckt.

Penicillium I wuchs submers am Bastband anfänglich nur langsam, hüllte es aber schließlich mit dichtem weißen Hyphengeflecht ein. Nach 6 Monaten war die Zellulose der Bastzellen vollkommen gelöst worden, während, wie bei *Trichoderma*, Reste der Mittellamelle erhalten geblieben waren. Im Hyphengeflecht fanden sich auch noch einige Membranreste der Markstrahlzellen.

Penicillium II keimte sogleich und trieb lange Hyphen, die sich zu einer dichten Watte verflochten. In der Niveauregion bildeten sie reichlich Koremien. Nach 6monatlicher Kultur war die gesamte Zellulose verschwunden. An ihrer Stelle war ein kräftiges Hyphengeflecht entstanden.

Penicillium III. Submers waren von den Bastbändern aus Hyphen in die umgebende Flüssigkeit ausgesandt. Am Glas hatten

in der Luft sich spärliche Konidienträger gebildet. Nach 6monatlicher Kultur ergab die mikroskopische Untersuchung, daß der Pilz die Substanzen der Mittellamelle zum Teil ausgenutzt, dagegen die Zellulose der Bastzellen vollkommen unverändert gelassen hatte.

Aspergillus I (niger). Um den Bast herum fluteten nach 1 Monat reichlich kürzere Hyphen (2 mm lang) und bald wurde im Niveau eine lockere Decke gebildet, die einige Konidienträger trug. Wachstum ging des weiteren nicht mehr vonstatten.

Die mikroskopische Untersuchung zeigte eine teilweise Isolierung der Bastfasern, was die Auflösung der Pektinstoffe beweist, dagegen waren die Bastfasern selbst völlig intakt geblieben.

Aspergillus II. Nur ganz kurze Keimschläuche und Mycelien wurden ausgetrieben, die nicht weiter wuchsen. Ein Angriff auf die Bastfasern hatte nicht stattgefunden.

Eine Auflösung der Mittellamellen konnte nicht nachgewiesen werden. Der Verband der Zellen war vollkommen intakt.

β) Blattquerschnitte von *Clivia nobilis.*

Als weitere natürliche Zellulose wurden die Membranen des *Clivia*-Blattes verwendet.

Es wurden in Reagenzröhren mit Nährlösung (Niveauhöhe 3,5 cm) *Clivia*-Blattquerschnitte getan, so daß als einzige C-Quelle die Membranstoffe (ev. die Kutikula) dienen konnten. Denn durch die Reinigung mit 2 % NaOH während mehrerer Stunden, mit Eau de Javelle (2 Std. lang), Alkohol, Äther und Wasser waren die Inhaltsstoffe vollkommen entfernt worden.

Jedem Kulturröhrchen wurden ca. drei dünnere, keilförmige Schnitte und ein dickerer (1 mm) Querschnitt vom Blattrand zugefügt, welche alle zu Boden sanken.

Die Querschnitte zeigten auf der Blattoberseite eine nahezu glatte Epidermis, auf der Unterseite eine solche aus stark papillös vorgewölbten Zellen. Beiderseits befand sich eine sehr dicke Kutikula (richtiger gesagt: Kutikularschichten), die mit kräftigen Leisten und Zapfen fest mit den Zelluloseschichten der Membranen verzahnt war. Das Mesophyll bestand aus 30—40 Schichten großer Parenchymzellen, die in der Mitte des Blattes am größten waren und hier zahlreiche Interzellularräume aufwiesen. In Abständen

von $1^1/_2$—2 mm befanden sich in der Mitte des Blattes die Querschnitte der längsverlaufenden Gefäßbündel.

Von *Mycogone* war schon nach kurzer Zeit submers um die Schnitte ein dichtes Hyphengewirr gebildet und hatte reichlich Konidien entwickelt. Von den Schnitten aus erstreckten sich auch viele lange Hyphen nach oben und bildeten dort eine Myceldecke. Nach 40 Tagen zeigte sich bei mikroskopischer Untersuchung, daß die gesamte Zellulose in Lösung gegangen war. Von den Blattschnitten waren nur die Kutikularschichten mit ihren eigenartigen Zapfen übrig geblieben (Taf. V, Fig. 9).

An den Spaltöffnungen zeigten sich besonders schöne Auflösungsbilder. Durch Abschmelzung der Zellulose waren hier auch die kutinisierten Schichten vollkommen frei geworden und konnten, was an intakten Schnitten nicht so leicht möglich ist, bis weit in die innere Atemhöhle hinein verfolgt werden. Das ganze bot den Anblick wie nach Schwefelsäurebehandlung. Die Kutikularschichten wurden auch im weiteren von dem Pilze nicht angegriffen. Bei Wiederholung des Versuches waren sie noch nach 1 Jahr ebenso unverändert inmitten des Hyphengeflechtes erhalten geblieben.

Auch *Stachybotrys* zeigte bald reichlich submerse Hyphen, welche die Schnitte in kurzem vollkommen einhüllten und dann sich weiter erstreckten. Die Hyphen, welche die Oberfläche der Nährlösung erreicht hatten, bildeten nach einigen Wochen Luftkonidien aus.

Nach $1^1/_2$monatlicher Kultur waren von den dünnen Blattschnitten gerade so wie bei *Mycogone* nur noch die Kutikularschichten übrig geblieben, die Zellulose war vollkommen gelöst worden.

Cladosporium II hatte die Schnitte mit zahlreichen kurzen Hyphen umgeben. Die Zellulosemembranen waren schon nach 3 Monaten ganz aufgelöst. Die Kutikularschichten blieben vollkommen erhalten.

Ein sehr kräftiges Wachstum zeigten auch *Stemphylium* und *Trichoderma*, während das von *Botrytis*, *Penicillium I* und *II* dahinter wenig zurückblieb.

Nach $1^1/_2$ Monaten konnte bei *Stemphylium* und den beiden *Penicillium*-Formen starke Auflösung der Zellulose konstatiert werden. *Botrytis* und *Trichoderma* hatten nach ca. 3 Monaten neben den unverletzten Kutikularschichten nur noch Spuren der

Zellulose übrig gelassen. Der größte Teil der Membranzellulose des Mesophylls war von allen diesen Pilzen zu ihrem Wachstum verwendet worden.

Cladosporium I, Trichothecium, Penicillium III sowie *Aspergillus I* und *II* gelangten alle in den Kulturen zur Keimung. Sie zeigten in der Nähe der Schnitte auch alle ein bescheidenes Hyphenwachstum. Ein Angriff auf die Zelluloseschichten hatte selbst nach 7 Monaten in keiner der Kulturen stattgefunden. Im ganzen waren die Schnitte nach dieser Zeit gut erhalten, aber es hatte eine Verquellung der Mittellamellen stattgefunden; in den Kulturen von *Cladosporium I* und *Aspergillus* war die Mittellamelle vom Rande her aufgelöst worden und hatte dadurch eine teilweise Trennung der Zellen bewirkt.

γ) Stengelquerschnitte von *Impatiens glanduligera*.

Die Membranen der Stengelquerschnitte von *Impatiens* bildeten ein weiteres Versuchsobjekt. Die Stengel wurden mit dem Rasiermesser in dünne und dickere (ca. 2 mm) Querschnitte zerlegt. Zwecks Entfernung der Zellinhaltsstoffe wurden diese zunächst 5 Stunden in 2 % Natronlauge gelegt und dann mehrere Stunden mit Eau de Javelle behandelt. Für die dünneren Schnitte genügte ein 4stündiges Ausziehen, wogegen die dickeren Schnitte bis zu 10 Stunden in der Javelleschen Lauge belassen werden mußten. Die Schnitte wurden dann mit Wasser und Alkohol gründlich ausgewaschen.

Reagenzröhrchen mit Nährlösung erhielten darauf je drei dünne und einen dickeren Stengelquerschnitt und wurden mit den Pilzen beimpft.

Verschiedene Stadien der Lösung konnten bei *Stemphylium* in Parallelkulturen beobachtet werden. Nach ca. 1monatlicher Kultur hatte sich der Pilz kräftig entwickelt und auch schon Konidien gebildet. Das Kollenchym und die dünnen Zellwände von Mark und Rinde waren vollkommen in Lösung gegangen, dagegen hatten die dickwandigen Elemente des Holzringes dem Pilze noch Widerstand geleistet. Durch Auflösung der Mittellamellen waren die Gefäße und Tracheiden zwar bereits aus ihrem Verbande gelöst, ihre Membranen zeigten aber nur eine zarte, gitterförmige Streifung als Folge des Angriffs. Die Kutikula des Stengels war erhalten geblieben.

Nach weiteren 5 Monaten waren auch die Membranen der Wasserleitungsröhren vollkommen gelöst worden; die Kutikula war jedoch auch jetzt nicht verändert.

Mycogone hüllte die Schnitte sehr schnell mit einem dichten Hyphengeflecht ein, das reichlich Sporen entwickelte. Schon nach 1monatlicher Kultur zeigte sich beim Schütteln des Glases, daß die feste Konsistenz der Schnitte verloren gegangen, das Gewebe schon stark erweicht war. Nach weiteren 5 Monaten ergab die mikroskopische Untersuchung, daß der Pilz sämtliche Membransubstanzen gelöst hatte. Sowohl die Mittellamellen als auch die Verdickungsschichten aller Gewebe, des Markes, des Holzteils, der Rinde, einschließlich der Kollenchymleisten, waren verschwunden. Einzig wieder die Kutikula hatte dem Angriff des Pilzes widerstanden. Sie trat bei Färbung mit Jodjodkalium deutlich als gelbes Band hervor.

Stachybotrys hatte nach $6^1/_2$monatlicher Kultur gleichfalls den ganzen Schnitt bis auf die Kutikula mit ihren Zäpfchen aufgezehrt.

Botrytis entwickelte bald ein kräftiges, weißes Mycel. Nach $2^1/_2$monatlicher Kultur waren sämtliche Membranen der Schnitte gelöst worden, nur die Kutikula hatte dem Pilzangriff widerstanden. Sie lag als breites, äußerst dünnes Band zwischen den Hyphen.

Da nun *Botrytis* die Kutikula nicht zu lösen vermag, lag es nahe, nach mechanischen Durchbohrungen zu suchen, wie sie Miyoshi gerade für *Botrytis* beschreibt.

Auf ca. 20 qmm untersuchter Stengeloberfläche, die sich in der übrig gebliebenen Kutikula darbot, fand sich keine einzige Stelle, die als solche Durchbohrung gedeutet werden könnte. Ihr Fehlen erklärt sich leicht: es hatte der chemotropische Reiz gefehlt, der bei Miyoshi die Hyphe gewissermaßen mit Gewalt durch die Membran gezogen hatte.

Trichoderma entwickelte sich gut auf Kosten der Membranstoffe und hüllte die Schnitte mit einem dichten Mycel ein. Die mikroskopische Untersuchung der $2^1/_2$ Monate alten Kultur ergab, daß die Membranen des Holzes und der Rinde, einschließlich des Kollenchyms, gelöst waren. Dagegen waren noch Membranreste der Markzellen zwischen den Hyphen erhalten geblieben.

Von den Penicillien zeigten wiederum *P. I* und *P. II* sehr gutes Wachstum an den Schnitten. *Penicillium I* hatte schon nach $1^1/_2$ Wochen die Schnitte mit dichtem Mycel eingehüllt. Nach

$2^1/_2$ Monaten waren von den dünneren Schnitten alle Teile bis auf die Kutikula gelöst worden.

Auch *Penicillium II* hatte submers alle Schnitte schnell eingehüllt und binnen $2^1/_2$ Monate ihre ganze Zellulose in Lösung überführt.

Ein geringeres Pilzwachstum zeigten in diesen Versuchen wieder *Aspergillus I (niger)* und *II (spec.)*, ferner *Trichothecium* und abweichend von den anderen Spezies der gleichen Gattung *Penicillium III*.

Aber auch diese Formen entwickelten an den Schnitten ein deutliches Mycel. Da keine andere Kohlenstoffquelle vorhanden war, mußten sie die Schnitte angegriffen haben. Nach 7 Monaten waren die aus Zellulose bestehenden Verdickungsschichten der Zellen vollkommen intakt, dagegen hatten alle Pilze die Stoffe der Mittellamellen in Lösung gebracht. Nur die Zwickel zwischen den Markzellen waren neben den Verdickungsschichten erhalten geblieben und verhinderten das Gewebe am vollkommenen Zerfall in einzelne Zellen (Taf. V, Fig. 10).

Wie wir sahen, hatte die Kutikula bezw. die Kutikularschichten sich allen Pilzen gegenüber als resistent erwiesen. Die Zellulose war von einigen rein abgeschmolzen worden. Dadurch waren, ähnlich wie bei *Clivia*, an der Innenseite der Kutikula die bei intakten Schnitten kaum erkennbaren Kutikulazäpfchen über den Radialwänden freigelegt worden.

δ) Blattstücke von *Sambucus nigra*.

Blattstücke von *Sambucus nigra*, von 20—30 qmm Größe, wurden zwecks Entfernung der Zellinhaltsstoffe 14 Tage in Eau de Javelle gelegt.

Je zwei solcher Blattstücke kamen in Reagenzröhrchen mit Nährlösung. *Stemphylium*, *Mycogone*, *Stachybotrys* und *Penicillium II* wuchsen an den Schnitten am schnellsten. Sie trieben von dort aus lange Hyphen durch die Nährlösung bis zum Niveau, wo sie schon binnen kurzem Konidien lieferten. Nach 5 Monaten war von den Blattstücken nur noch die Kutikula erhalten. *Botrytis*, *Trichoderma* und *Cladosporium* entwickelten nur kürzere Hyphen. Sie lösten die Zellulosemembranen auf, wenn es ihnen auch nicht gelang, diese binnen 3 Monaten zum völligen Verschwinden zu bringen.

Aspergillus I und *Pyronema* vermochten überhaupt nur schlecht zu gedeihen. Bei mikroskopischer Untersuchung zeigte sich, daß das geringe Hyphenwachstum auf Kosten der Mittellamellen erfolgt war.

ε) Tierische Zellulose (Tunicin).

Zellulose tritt bekanntlich im Tierreich äußerst selten auf. Nur aus der Klasse der Tunicaten kennt man ihr Vorkommen in reichlicherem Maße. Das Hautepithel dieser Tiere scheidet Zellulose ständig ab, so daß schließlich ein dicker Mantel (tunica) davon das ganze Tier einhüllt und nur zwei Öffnungen freiläßt. Der Bildung nach ist der Mantel also eine Kutikula, er unterscheidet sich jedoch von gewöhnlicher Kutikula dadurch, daß stellenweise mesenchymatische Zellen in ihn eindringen.

Die Grundsubstanz, die bei einigen Formen faserig, bei anderen homogen ist, wurde von Berthelot, dann von Löwig und Kölliker eingehender chemisch untersucht. Die Elementaranalyse ergab die Formel $(C_6H_{10}O_5)n$. Da auch mit Jod und Schwefelsäure Blaufärbung eintrat und viele andere typische Zellulosereaktionen glückten, konnte das „Tunicin" chemisch mit pflanzlicher Zellulose identifiziert werden.

Für meine Zwecke benutzte ich tierische Zellulose aus dem Mantel der im Mittelmeer häufigen *Phallusia mammillata*. Um die dem Zellulosemantel eingelagerten Stoffe zu extrahieren, bediente ich mich folgender Methode.

Mit dem Rasiermesser wurden aus dem Mantel Scheiben geschnitten, die ca. 1—2 cm groß und $^1/_2$—1 mm dick waren. Diese wurden mit Wasser, Alkohol, Äther und wieder Alkohol von verschiedenen Konzentrationen während mehrerer Tage ausgewaschen; darauf mehrere Tage bei geringer Erwärmung mit wässeriger und alkoholwässeriger KOH ($2^1/_2$ %) extrahiert und zum Schluß mit Wasser und Alkohol gründlich nachgewaschen. Hierdurch wurden die Fremdstoffe, besonders die zuvor in geringer Menge vorhandenen Eiweißstoffe entfernt; höchstens blieben geringe Spuren des Albuminoids (Elastin?) in den Wandungen der zarten Blutgefäße zurück. So erhielt ich ganz oder doch beinahe reine unoxydierte Zellulose, die ihre natürliche Struktur vollkommen bewahrt hatte.

Die so erhaltenen Schnitte zeigten sich unter dem Mikroskop aus glasig durchsichtiger, undeutlich gekörnter Substanz bestehend.

Diese Masse war von vielen blasigen oder ellipsoidischen Hohlräumen von 30—100 μ Durchmesser durchsetzt (was dem ganzen ungefähr das Aussehen eines stark kollenchymatischen Pflanzengewebes gab) und daneben vereinzelt von baumartig verzweigten Blutgefäßen durchzogen.

In den Kulturen zeigte sich das gleiche Verhalten der Pilze, wie in denen mit Schnitten durch Pflanzenteile. Da die Schnitte auch hier vollkommen in die Nährlösung untertauchten, wuchsen die Pilze zunächst submers. Schon nach wenigen Tagen waren alle Schnitte, wenn auch in verschiedenem Grade mit flutenden Hyphen umgeben. Von hier aus wuchsen letztere vorwiegend zur Luft, was bei *Stachybotrys*, *Mycogone* und *Trichoderma* besonders schnell ging, so daß diese Formen nach 12tägiger Kultur schon eine zarte, schwimmende Hyphendecke zeigten. Die mikroskopische Prüfung der einzelnen Schnitte ließ zu dieser Zeit noch keinen deutlichen Angriff erkennen. Darum darf man dieses bescheidene Wachstum wohl teilweise auf Ausnutzung von Verunreinigungen zurückführen. Im weiteren Verlauf ließ das kräftigere Wachstum nur eines Teils der Pilze auf ihr Vermögen schließen, die reichlich vorhandene C-Quelle auszunutzen. Die anderen Formen stellten bald ihr Wachstum ein. Zu den letzteren gehörten: *Trichothecium*, *Cladosporium I*, *Penicillium III*, *Aspergillus I* und *II* sowie die Phycomyceten.

Als endgültiges Kriterium konnte auch in diesen Kulturen wieder nur die tatsächlich zu beobachtende Veränderung der Zellulose dienen. Bei den am kräftigsten entwickelten Formen: *Mycogone* und *Stachybotrys* war die gesamte Zellulose der Schnitte aufgelöst worden; bei den nahezu gleich kräftig gewachsenen *Stemphylium*, *Trichoderma*, *Penicillium II* und den etwas schwächer entwickelten *Botrytis*, *Penicillium I* und *Cladosporium III* waren nur noch geringe krümelige Zellulosereste zurückgelassen worden, welche von ihrer ehemaligen Struktur aber nichts mehr erkennen ließen. In den Kulturen sämtlicher anderer Pilze konnte an den Schnitten unter dem Mikroskop keine Veränderung wahrgenommen werden; wenn sie auch schwächeres Mycel und zum Teil spärliche Konidien entwickelt hatten, so waren sie doch nicht imstande, auf Kosten der Zellulose zu gedeihen.

c) Hemizellulosen.

α) Endospermschnitte von *Phoenix dactylifera.*

Die verwendete Hemizellulose des Dattelendosperms liefert bei der Hydrolyse (nach E. Schulzes Untersuchungen) Galaktose und Mannose. Sie bildet die bekannten Verdickungsschichten der Membran, die bei Keimung des Samens in Lösung gehen[1]).

Querschnitte durch Dattelkerne wurden ungereinigt in Reagensröhrchen mit Nährlösung getan und die Kulturgefäße reichlich mit Pilzsporen beimpft.

Schellenberg[2]) hat eine Reihe von Pilzen auf ihr Verhalten gegen die Membran des Dattelendosperms untersucht und gefunden, daß diese den Angriffen kräftig widerstand. Nur zwei seiner Pilze waren imstande, diese Hemizellulosen zu verändern. Eine von seinen drei isolierten *Penicillium glaucum*-Arten bewirkte eine „Abschmelzung der Schichten" und zwar ohne zuvor eine „Aufquellung" zu verursachen, oder eine „besondere Lösungszone" zu differenzieren. Der andere Pilz, *Trichothecium roseum*, löste Verdickungsschichten und Mittellamellen meist gleichzeitig, nur an wenigen Stellen die letztere früher. Es traten nach Schellenberg dabei „reine Abschmelzungsfiguren, Korrosionsstacheln" auf. Die Auflösung ist also ungleich und bevorzugt einige Stellen. Eine nähere Beschreibung dieser Abschmelzungsfiguren wird von Schellenberg nicht gegeben.

In meinen Versuchen gedieh *Mycogone* an den Dattelschnitten sehr schnell. Die Sporen keimten sogleich mit langen, fädigen Hyphen aus und bildeten nach kurzer Zeit reichliche Konidien an den submersen Hyphen, welche die Schnitte einhüllten.

Nachdem der Pilz 40 Tage gewachsen, waren die Schnitte bis auf die letzten Spuren aufgelöst. Die Übergangsstadien bei der allmählichen Auflösung der Membranen wurden bei dieser Form nicht beobachtet.

Stemphylium zeigte nach kurzer Zeit ein kräftiges Wachstum, das aber ausschließlich submers blieb und auch hier nur in der

1) Firtsch, Anatom.-physiol. Untersuchungen über die Keimpflanzen der Dattelpalme (S. 342). Sitzungsber. d. K. Akad. d. Wiss. zu Wien, 1886, Bd. XCIII, 1. Abt.

2) Schellenberg, a. a. O., S. (3).

Nähe der Schnitte stattfand. Da der Pilz langsamer wuchs wie *Mycogone*, konnte hier die Art des Membranangriffs und sein Fortschreiten sehr gut beobachtet werden.

Nach 40tägiger Kultur wurden einige Schnitte mit dem daran flutenden Mycel mittels einer sterilisierten Platinnadel aus der Lösung genommen und mikroskopisch untersucht. Diese zeigten die verschiedensten Übergangsstadien von geringer Korrosion bis zu beinahe vollkommener Lösung (Taf. V, Fig. 11).

Als erster Angriff war eine Verquellung der innersten Membranschichten zu konstatieren, die zu einem Unscharfwerden der Grenzlinie (resp. -fläche) führte. Darauf traten in der Umgebung der Tüpfel eigenartige Differenzierungen auf. Es begann von der Mitte der Schließhaut eine Auflösung der hier nur sehr dünnen Verdickungsschichten, so daß die Mittellamelle in einer Kreisfläche beiderseits bloßgelegt wurde, was sich auf den Tüpfeln in der Flächenansicht und auf den im Schnitt getroffenen deutlich zu erkennen gab (Taf. V, Fig. 11*b*, *c*, *f*).

Dann schritt die Auflösung der Hemizellulose in eigenartiger Weise fort. An der vorher ganz glatten Wand der Tüpfelkanäle traten durch ungleichmäßige Auflösung lange spalt- und rißförmige Gruben und Vertiefungen (Fig. 11*b*, *c*) auf, so daß der in der Flächenansicht zuvor kreisförmige Tüpfel jetzt einem Stern glich (Fig. 11*e*). An den Verdickungsschichten fand dann die Auflösung ungefähr gleichmäßig statt, bis schließlich nur noch die Mittellamelle übrig blieb. Von den in der Kultur verbliebenen Schnitten ließen sich nach 8monatlichem weiteren Pilzwachstum keine Spuren mehr entdecken; auch die Mittellamellen waren der Auflösung verfallen.

Die soeben beschriebene Auflösung war in ein und demselben Schnitt nicht überall gleichmäßig erfolgt, vielmehr war sie an den äußersten Stellen am weitesten vorgeschritten, was ja ohne weiteres verständlich ist.

Stachybotrys entwickelte ein kräftiges vegetatives Hyphengewirr ausschließlich submers an den Schnitten.

Nach $2^1/_2$monatlicher Kultur waren die Schnitte verschwunden bis auf die daran befindliche Samenschale, welche aus inkrustierter Membran bestand.

Trichoderma entwickelte nur kümmerliches submerses Mycel; die Dattelschnitte boten dem Pilz offenbar keine geeigneten Nährstoffe für sein Wachstum. Nach 7 Monaten waren die Membranen

des Endosperms noch ganz erhalten. Weder die Verdickungsschichten noch die Mittellamellen zeigten Korrosionen. Der Pilz ist also unfähig diese Hemizellulose auszunützen.

Botrytis wurde als Mycelflocke übergeimpft. Diese wuchs noch einige Zeit weiter und bildete auch einige submerse Sklerotien. Die Hyphen berührten die Schnitte zum Teil, wuchsen aber nicht daran fest und hüllten sie auch nicht dicht ein. Nach $6^1/_2$ Monaten war kein Angriff auf die Membranen erfolgt.

Auch Schellenberg hat bei allerdings kürzerem Kontakt von *Botrytis cinerea* deBy und von *Botrytis vulgaris* Fr. mit Dattelendosperm keine Auflösung beobachtet.

Bei *Trichothecium* keimten die reichlich geimpften Sporen bald aus und entwickelten submers Mycelflocken. Die oberflächlich schwimmenden bildeten an der Luft Konidien. Das Wachstum stand jedoch bald still. Nach $6^1/_2$ Monaten waren nicht die geringsten Veränderungen weder an den Verdickungsschichten noch an den Mittellamellen eingetreten. Dies steht im Gegensatz zu dem Befunde Schellenbergs, der gerade bei *Trichothecium roseum* nach kurzer Zeit Abschmelzung und Korrosion beobachtet hat. Der Widerspruch ist schwer zu deuten. Daß etwa bei meiner Versuchsanordnung die Lebensbedingungen des Pilzes ungünstige waren, ist nicht anzunehmen, da bei analoger Anordnung und günstiger C-Quelle (Glukose) ein kräftiges Wachstum erfolgte.

Die reichlich übergeimpften Sporen von *Cladosporium II* keimten zwar zum Teil aus, entwickelten aber kein beträchtliches Mycel. Nach $6^1/_2$monatlicher Kultur war an den Endospermschnitten keine Veränderung wahrzunehmen. Das stimmt mit dem Befunde Schellenbergs (für *Cl. herbarum*) überein.

Penicillium I wuchs zunächst sehr langsam, aber nach etwa 2 Monaten waren die Schnitte von einem dichten Pelz zarter Hyphen umgeben. Nach $6^1/_2$monatlichem Wachstum waren die Endospermwände weitgehend gelöst. Nur noch an wenigen Stellen waren dünne Schichtenreste erhalten; die Mittellamellen waren meist vollkommen freigelegt worden, selbst aber intakt geblieben und ließen noch die regelmäßige Zellform erkennen.

Abweichend hiervon verhielten sich die beiden anderen untersuchten *Penicillium*-Arten *II* und *III*, welche die Schnitte intakt ließen.

Spärliches Wachstum wies *Aspergillus II spec.* auf. Nach 1 Monat hatte sich wenig Mycel entwickelt, aber immerhin waren mehrere Hyphen bis zum Niveau gewachsen und hatten hier Konidien ausgebildet. Der Pilz wuchs langsam in der Umgebung der Schnitte weiter, und nach $6^1/_2$monatlicher Kultur waren diese stark korrodiert. Die Mittellamellen waren meist deutlich erhalten.

Aspergillus niger wuchs kräftiger und schneller, hauptsächlich in der Umgebung der Schnitte. Letztere waren schon nach $1^1/_2$ Monaten kaum noch zu erkennen. Zu dieser Zeit hatte das Mycel an der Luft schon Konidienträger gebildet. Nach 6 Monaten fanden sich im Hyphengeflecht nicht die geringsten Reste der Schnitte mehr.

β) Endospermschnitte von *Coffea arabica.*

Die Zellulose, welche die Verdickungsschichten im Endosperm des Kaffees bildet, forderte nach den Versuchsergebnissen E. Schulzes zu einer Untersuchung heraus. Denn wie Schulze fand, ist sie wegen einer ihrer Eigenschaften als echte Zellulose anzusprechen, wegen mehrerer anderer dagegen den Hemizellulosen zuzurechnen. Dieses Kohlehydrat hat nämlich mit der Baumwollzellulose die große Resistenz gegen hydrolysierende Substanzen gemeinsam, indem es erst durch Schwefelsäure von ca. 75 % in Zucker gespalten wird. Da hierbei jedoch neben Dextrose auch reichlich Mannose gebildet wird, wurde der Stoff von Gilson zu den Hemizellulosen gerechnet.

Um gute Untersuchungsobjekte zu bekommen, wurden Querschnitte durch Kaffeebohnen von ihren Zellinhaltstoffen durch wiederholte Behandlung mit Eau de Javelle, Wasser, Alkohol und Äther bei gewöhnlicher Temperatur befreit. Hiernach blieben von den Schnitten nur die stark verdickten, mit vielen Tüpfeln versehenen Zellwände übrig, in denen keinerlei Schichtung und auch keine Differenzierung der Mittellamellen zu erkennen war. Die äußerst dünne Samenschale, die sog. „Silberhaut" blieb erhalten.

Die Versuche zeigten, daß alle Pilze, wenn auch in verschiedenem Maße, in den Kulturen zur Entwicklung kamen. Schon aus der Mycelernte konnte man Schlüsse auf die nur teilweise Ausnutzung des Substrats ziehen. Die mikroskopische Untersuchung verschaffte jedoch erst die Gewißheit, daß nicht alle Pilze ihr Wachstum auf Kosten des Dextrosemannans aus den Verdickungsschichten bestritten hatten. Zunächst zeigte sich: Alle

die Pilzformen, welche sonst das reine Dextrosesaccharid ausgenutzt hatten, lösten auch hier das mannosehaltige Dextrosesaccharid vollkommen auf. Diese Formen waren: *Stemphylium*, *Mycogone*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Botrytis*, *Cladosporium II*, *Penicillium I* und *II*.

Außer diesen Pilzen jedoch erwiesen sich auch drei andere: *Trichothecium*, *Pyronema* und *Aspergillus (I) niger*, die Dextrosezellulose nie auflösten, befähigt, das Mannan des Kaffeeendosperms ganz zum Verschwinden zu bringen und ein kräftiges, stark fruktifizierendes Mycel zu entwickeln.

Geschildert sei hier kurz das Wachstum von *Pyronema confluens*. Es entwickelte schnell an den Schnitten ein kräftiges, submerses Mycel. Nach 2 Wochen waren erstere nur noch in den Umrissen zu erkennen. Die Hyphen wuchsen dann, eine lockere Watte bildend, in die Luft und entwickelten nach ca. einem Monat dicht über dem Niveau der Nährlösung reichlich Fruktifikationsorgane. Die letzten Reste der Schnitte waren inzwischen verschwunden.

Die übrigen Pilze brachten auch Mycelien hervor, die aber nach ca. 1 Monat und weniger ihr Wachstum einstellten.

Die Untersuchung ergab, daß keiner der Pilze: *Cladosporium I*, *Penicillium III*, *Aspergillus II*, *Mucor I*, *Mucor III*, *Mucor spinosus I* und *II* sowie *Rhizopus* die Hemizellulose der sekundären Verdickungsschichten angegriffen hatte. Das Wachstum der Pilze war durch Auflösung der Mittellamellenstoffe erfolgt (Taf. V, Fig. 12).

d) Inkrustierte Zellulosen.

α) Verholzte Membranen.

Da die auf technischem Wege von ihren Inkrusten befreite Zellulose von einer größeren Zahl von Pilzen so gut verarbeitet wurde, so stellte ich mir noch die Aufgabe, verholzte Membranen auf ihre Widerstandsfähigkeit gegen die Enzyme der kultivierten Pilze zu untersuchen. Für die Versuche mit verholzten Membranen dienten mir Rasiermesserschnitte durch einen etwa 10jährigen Zweig von *Tilia parvifolia*.

Da der Zweig im Herbst abgeschnitten war, enthielten die Zellen in beträchtlicher Menge Reservestoffe. Um jedoch die verholzte Membran nicht chemisch zu verändern, wurden die Schnitte nur von demjenigen Zellinhaltsstoffe befreit, der sich in warmem

Wasser löste. Die Holzschnitte wurden dann in Nährlösung, die wiederum keine weiteren Kohlenstoffverbindungen enthielt, den Pilzen als Substrat dargeboten.

Auf Kosten der nicht entfernten Zellinhaltsstoffe (d. s. Eiweißkörper, Stärke, fettes Öl) entwickelten sich in den Kulturen alle Pilze sehr schnell und zwar wiederum zunächst direkt an den am Grunde der Lösung schwimmenden Schnitten. Von hier aus wuchsen bei den meisten Formen lange, flutende Hyphen zum Niveau, wo sie sich ausbreiteten und, wie schon in anderen Versuchen, mit Ausnahme von *Mycogone* erst hier Sporen bildeten.

Stichproben ergaben dann Veränderungen, die inzwischen mit den Schnitten vorgegangen waren. So waren z. B. in der *Stachybotrys*-Kultur bei gutem Pilzwachstum nach 1 Monat zwar keine Inhaltsstoffe mehr in den Zellen des Holzes zu entdecken, doch war andererseits an den Membranen keine Veränderung der Holzreaktion und auch keine Korrosion zu beobachten. Beim Weiterwachsen des Pilzes litt er aber offenbar Mangel an leicht erreichbaren C-Verbindungen, denn er veränderte jetzt die Inkrusten. Nach 5 Monaten zeigte sich bei *Stachybotrys* nur noch an den Wandungen der Gefäße und denen der Markstrahlzellen eine ganz schwach-rötliche Färbung mit Phlorogluzin und Salzsäure. Dieselbe Veränderung hatten nach dieser Zeit auch mehrere andere Pilze bewirkt: *Mycogone*, *Stemphylium*, *Trichoderma*, *Trichothecium* und *Cladosporium I* und *II*.

Bei *Aspergillus I* und *II*, *Pyronema* und sämtlichen kultivierten *Mucor*- und *Rhizopus*-Arten war die Herauslösung der die erwähnte Farbenreaktion bedingenden Substanzen noch weiter gegangen, die Färbung trat gar nicht mehr auf.

Abweichend verhielten sich alle untersuchten *Penicillium*-Arten *(I, II* und *III)* sowie *Botrytis* und *Pyronema*. Bei ihnen war trotz kräftigeren Mycelwachstums selbst nach 10 Monaten die Rotfärbung noch ebenso ungeschwächt wie in der unbeimpften Kontrollkultur.

Da in der ersten und zweiten der soeben angeführten Gruppen der die charakteristische Färbung gebende Stoff durch das Pilzwachstum entfernt worden war, so war es nicht ausgeschlossen, daß die Pilze, welche zur Auflösung echter Zellulose befähigt sind, nunmehr die übrig bleibenden Teile der Holzschnitte in Lösung bringen würden. Dies geschah jedoch nicht. Selbst nach 10 Monaten

waren die Schnitte noch erhalten. Die Prüfung mit Jod und Schwefelsäure gab hierfür die Erklärung: Nach Entfernung des die Phlorogluzin-Salzsäurereaktion ergebenden Stoffes war nämlich nicht reine Zellulose übrig geblieben, denn statt der Blaufärbung trat immer noch eine Gelbfärbung mit Jod und Schwefelsäure auf. Dies konnte keine andere Erklärung finden, als die, daß nach Entfernung des Hadromals, welches ja nach Czapek der Träger der Phlorogluzinfärbung ist, immer noch andere Stoffe, etwa Ligninsäuren u. dgl., zurückblieben, welche die Zellulose der verholzten Zellwände vor den Angriffen des Pilzes schützten.

β) Verkorkte Membranen.

Verkorkte Membranen aus der Rinde von *Quercus suber* wurden als weiterer Typus inkrustierter Membranen untersucht.

Da manche Schimmelpilze nach Ohta (1911) fetthaltige Substrate zu ihrer Entwicklung auszunutzen vermögen und nach Rousoys Untersuchungen auch gewisse Mucorineen auf fettsäurehaltigem Nährboden gedeihen, wollte ich feststellen, ob die von mir kultivierten Pilze etwa die im Suberin nach van Wisselingh enthaltene Phellonsäure oder ähnliche Stoffe herauszulösen vermöchten.

Aus den kutinisierten Membranen hatte sich in den früheren Versuchen (s. o.) durch die Pilze nichts herauslösen lassen. Es war festzustellen, ob die ihnen nahestehenden Suberinlamellen des Korkes sich anders verhalten.

Aus Flaschenkork wurden mit dem Rasiermesser Querschnitte angefertigt und einer Reinigung unterzogen.

Zunächst wurden die Schnitte 6 Tage lang bei gewöhnlicher Temperatur in $2^1/_2$proz. Kalilauge gelegt und dann nacheinander mit Äther, Alkohol (96 %) und Wasser extrahiert.

Durch diese Behandlung war das leicht lösliche Wachs (im Sinne von de Bary und v. Höhnel) herausgelöst, dagegen waren die als „Suberin" bezeichneten Stoffe offenbar nicht entfernt worden, denn die Membranen gaben noch die hierfür charakteristischen Reaktionen. Die gereinigten Schnitte wurden in Reagenzröhrchen mit Nährlösung getan, und die so erhaltenen Kulturgefäße wurden reichlich mit Sporen beimpft.

Alle Pilze gelangten in den Kulturen zur Keimung und wuchsen einige Zeit in ungleichem Maße weiter. Meist stellten sie schon

nach kurzer Zeit ihr Wachstum ein, nachdem sie nur ein kleines, kümmerliches Mycel hervorgebracht hatten. Nur *Mycogone* und *Stachybotrys* bildeten ein etwas ansehnlicheres Mycel. Daraus, daß sie in unmittelbarer Nähe der Schnitte wuchsen, muß wohl geschlossen werden, daß sie diesen irgendwelche Stoffe entzogen. Es ließ sich jedoch nach 6monatlichem Kontakt zwischen Hyphen und verkorkten Zellwänden mittels mikrochemischer Reaktionen nicht feststellen, daß ein oder mehrere Stoffe durch das Pilzwachstum verschwunden waren. Korrosion der Membranen war nicht erfolgt und alle Reaktionen verliefen vollkommen gleich bei den Schnitten aus den Pilzkulturen und denen aus den unbeimpften Kontrollkulturen.

3. Versuche mit verschiedenen Stickstoffquellen.

Nachdem so durch eine größere Zahl von Versuchsreihen das Verhalten der Pilze gegen die Zellulosen hinreichend geklärt war, versuchte ich noch weiter durch Experimente den Einfluß der Stickstoffquelle bei sonst gleichbleibenden Verhältnissen zu erforschen.

In dem angestellten Versuche fanden von anorganischen Verbindungen 1. Nitrat-Stickstoff, 2. Ammonium-Stickstoff allein oder gemeinsam Verwendung.

Von organischen Verbindungen wurde 1. Asparagin, 2. Pepton, und 3. Glykokoll herangezogen.

Da Asparagin bei Gegenwart geeigneter C-Quellen auch allgemein als günstiger N-Lieferant für Pilze angesehen wird [Czapek[1]), 1901], hatte ich es neben Pepton und Glykokoll, wie schon oben angeführt, in mehreren Versuchen zugesetzt, um hierdurch auch die schwach wachsenden Pilze anzuregen. Die beiden letzten Stoffe wurden von allen untersuchten Pilzen in der angewendeten Konzentration (0,1 %) unter Zugabe von Ammoniumnitrat gut ausgenutzt, gleichgültig ob sie allein oder mit Zellulose gegeben wurden. Die Zellulose verhielt sich hierbei wie in den meisten anderen Fällen: sie wurde von einem Teil der Pilze gelöst und zwar vollkommen und von dem anderen unverändert gelassen.

1) Czapek, a. a. O., S. (11).

Abweichendes Verhalten zeigte jedoch das Asparagin (s. o.). Bei den Versuchsreihen, wo es in 0,1 % und verdünnterer Lösung Anwendung fand, wurde es von den Pilzen schließlich ziemlich gut aufgenommen, wobei sich eine geringe Abscheidung von Ammoniak feststellen ließ.

In einer Konzentration von 0,25 % wurde es auch ausgenutzt, die Pilze gediehen aber sehr viel langsamer als in der Vergleichskultur mit der gleichen Konzentration Glukose. In dieser Konzentration wurde Asparagin auch von denjenigen Pilzen als C-Quelle verwendet, welche nach meiner Erfahrung Zellulose nicht auszunutzen vermögen (s. o.). Diese wuchsen, stellten jedoch nach ca. 1—2 Monaten das Wachstum vollkommen ein, und griffen die daneben vorhandene Zellulose nicht an.

Die zur Zelluloselösung befähigten Pilze hingegen ließen sich in dieser Versuchsreihe für längere Zeit ihre Zellulaseausscheidung (entgegen früherer Annahme) sicher nicht unterbinden; ob dies vorübergehend stattfand, konnte nicht einwandfrei entschieden werden. Jedenfalls waren nach 1monatlicher Versuchsdauer schon die Anfänge der Zelluloselösung durch Korrosionsfiguren festzustellen.

Aber eine allgemeine Hemmung wurde durch Asparagin im Wachstum der höheren Pilze doch bewirkt und diese bezog sich auf die Fruktifikation. Ein Teil der sonst üppig Fortpflanzungszellen treibenden Pilze, so z. B. *Trichoderma*, *Stachybotrys*, *Penicillium I*, *Cladosporium I* und *Cladosporium II*, wuchsen in den Kulturen ausschließlich vegetativ, und auch die anderen zeigten ein ähnliches Verhalten. Sie bildeten nur äußerst wenig Konidien auf kümmerlichen Trägern, so z. B. *Mycogone*, *Botrytis*, *Penicillium II*, *Aspergillus I*.

Eine Beeinträchtigung der Keimfähigkeit fand jedoch nicht statt. Falls die Sporen auf den geeigneten Nährboden gebracht wurden, entwickelten sie wieder ganz normales, reichlich fruktifizierendes Mycel.

Wurde eine Konzentration von 1 % Asparagin gewählt, so zeigte sich starke Hemmung. Keine der ausgewählten Formen vermochte in dieser Lösung zu gedeihen, gleichgültig, ob außerdem Zellulose zugesetzt war oder nicht.

Zunächst vermutete ich, daß das Asparagin in etwas stärkerer Konzentration auf das Protoplasma der Pilze giftig wirken könnte. Hiergegen spricht aber die folgende Tatsache: Enthielt die Nähr-

lösung außer 1 % Asparagin auch 1 % Glukose, so gediehen die Pilze schließlich sehr üppig, nachdem sie anfänglich langsam gewachsen waren, und setzten reichlich Konidien an. Die Hemmung wurde also allmählich rückgängig gemacht.

Ich beschränke mich auf die Mitteilung dieser Beobachtung. Für geklärt kann man die Frage über den Einfluß des Asparagins nach diesen Ergebnissen keineswegs betrachten. Im Gegenteil fordert das merkwürdige Verhalten zu neuer eingehender Nachprüfung der Enzymausscheidung bei wechselnder Konzentration der Asparaginlösung auf. (Die experimentelle Nachprüfung habe ich vorläufig aufgeschoben, da die Frage außerhalb des Rahmens meines Themas liegt.)

Betreffs der Ausnutzung der anorganischen Stickstoffverbindungen habe ich nur mit *Mycogone* experimentiert.

Das Ergebnis ist kurz folgendes: Mit Nitrat, als einziger N-Quelle vermochte der Pilz weder zu gedeihen, wenn er Zellulose als C-Lieferer bekam, noch wenn er Glukose erhielt. Mit Ammoniumsulfat als einziger N-Quelle gedieh der Pilz gut und nutzte Zellulose als einzige C-Quelle aus. Völlig gleichgültig blieb es, ob $CaCO_3$ zum Neutralisieren der freiwerdenden Schwefelsäure hinzugetan wurde oder nicht.

IV. Nachweis der Enzyme[1–7]).

Aus den Ergebnissen meiner Versuche ging ohne weiteres hervor, daß der hydrolytische Abbau der Zellulosen nicht durch Säure als Ausscheidungsprodukt der Pilze bewirkt wurde; er konnte also nur durch Enzyme bedingt sein. Dennoch unterließ ich es nicht, dieselben tatsächlich nachzuweisen.

1) Euler, Allgemeine Chemie der Enzyme. Wiesbaden 1910. — Derselbe, Grundl. u. Ergebnisse der Pflanzenchemie. Braunschweig 1908.

2) Czapek, a. a. O., S. (11).

3) Oppenheimer, Die Fermente und ihre Wirkungen. Leipzig 1903.

4) Reynolds Green, Enzyme. Deutsch von Windisch. Berlin 1910.

5) Omelianski, Über Gärung der Zellulose. Zentralbl. f. Bakt., II. Abt., 1902 bis 1912, Bd. 8, 9, 10, 11, 31. — Derselbe u. in Lafars Hdb. d. techn. Mykologie, Jena 1904/06, Bd. 3, S. 245—268.

6) Haberlandt u. Zuntz, a. a. O., S. (8).

7) Mc Beth, J. E. and Scales, F. M., The destruction of cellulose by bacteria and filamentous fungi. [U. S. Dep. of Agriculture, Bureau of Plant-Industry, Bull. 266; 1913.]

In Kulturen mit kräftiger Pilzentwicklung wurde das Mycel zerquetscht, so daß die wasserlöslichen Zellinhaltsstoffe in die Nährlösung übergingen; diese wurde durch Fließpapier filtriert. Die Lösung, welche also die etwa vorhandenen Enzyme aufgenommen hatte, wurde darauf mit Protoplasmagiften, wie Toluol und Chloroform, sterilisiert und dann Zelluloseproben verschiedener Herkunft (wie oben verwendet) hineingetan. Fast in allen Versuchen gelang es, Übereinstimmung in der Wirksamkeit der lebenskräftigen Pilze und der ihnen entsprechenden Filtrate nachzuweisen.

Nach längerer oder kürzerer Zeit hatte bei *Botrytis*, *Cladosporium II*, *Penicillium I* und *Penicillium II* kräftige Korrosion und bei *Stemphylium*, *Mycogone*, *Stachybotrys* und *Trichoderma* völlige Auflösung der Proben (Lein- und Baumwollfaser) stattgefunden.

Eine Schädigung des Enzyms war durch die Behandlung mit Toluol nicht erfolgt. Chloroform aber hatte anscheinend irgendwie schädigend eingewirkt. Bei gleicher Menge enzymhaltiger Nährlösung und gleichem Volumen Toluol und von Chloroform fand die vollkommene Auflösung im letzteren Falle bedeutend langsamer statt und bei zwei Pilzen *(Penicillium I* und *Botrytis)* unterblieben die Korrosionen.

Weiterhin wurden auch die von der lebenden Zelle normalerweise in gut gediehener Kultur ausgeschiedenen Sekrete auf wirksames Enzym hin untersucht.

Bei Zusatz verdünnten Alkohols zu alter Nährlösung wurden allgemein proteinartige Stoffe ausgefällt, welche die Lösung zunächst opalisierend machten und darauf nach Art der Kolloide nur sehr langsam zu Boden sanken.

Diese Fällung zeigte sich als heterogen, denn in Wasser ging nur ein Teil davon in Lösung (welcher sich mit Alkohol wiederum ausfällen ließ).

Mit der Lösung des ersten Alkoholniederschlages wurden Versuche über Zelluloseauflösung bei Sterilisation mit Toluol angestellt. Sie glückten nicht in allen Fällen, es gelang aber bei mehreren Pilzen starke Korrosionen an Leinfasern hervorzurufen.

Für verschiedene Fermente ist früher nachgewiesen worden, daß sie nur dann von der Zelle reichlich produziert werden, wenn sie gebraucht werden, d. h. wenn keine geeigneten gelösten Nährstoffe zugegen sind. Experimentiert wurde hauptsächlich mit

Sekreten tierischer Zellen, aber auch mit denen von Pflanzen sind einige Versuche angestellt worden. Wie diese qualitative und quantitative Regulierung zu erklären ist, bedarf noch weiterer Forschung. Dafür, daß es sich hier vielleicht um eine Aktivierung vorhandener Vorstufen handelt, hat Haberlandt u. a. für den Spezialfall der Gramineen-Keimlinge verschiedene Anhaltspunkte gegeben.

Über regulatorische Ausscheidung der Zellulase liegen bisher überhaupt keine Beobachtungen vor, da die Bakterien (mit deren Enzym ja bisher allein gearbeitet wurde) ihre Enzymausscheidung anscheinend nicht beeinflussen lassen.

Das Ergebnis meiner Versuche ist kurz formuliert folgendes: Sind günstige, gelöste Kohlenstoffquellen in geringer Konzentration in der Nährlösung enthalten, so erleidet die Enzymausscheidung dadurch keine Beeinflussung, sind diese Stoffe dagegen in großer Menge vorhanden, so unterbleibt die Sekretion des Enzyms. In diesem Falle wird die gelöste Kohlenstoffquelle allein ausgenützt und die ungelöste Zellulose bleibt ungemindert erhalten.

Zusammenfassung.

Im folgenden seien die Hauptergebnisse meiner Untersuchungen noch einmal kurz zusammengestellt.

Zu den Versuchen wurde eine größere Zahl von Pilzen verwendet, die zu den folgenden Gattungen gehörten:

1. *Stemphylium*, 2. *Macrosporium*, 3. *Mycogone*, 4. *Stachybotrys*, 5. *Trichoderma*, 6. *Botrytis*, 7. *Trichothecium*, 8. und 9. *Cladosporium*, 10.—13. *Penicillium*, 14. und 15. *Aspergillus*, 16. *Pyronema*, 17.—21. *Mucor*, 22. *Rhizopus*.

Die typischen Holzpilze wurden nicht herangezogen.

Als Substrat wurde nicht nur sogenannte echte Zellulose in Form von Fließpapier dargeboten, sondern Typen der verschiedensten natürlichen Zellulosen, sowohl pflanzlicher als auch tierischer Herkunft, und solche der durch chemische und technische Prozesse mehr minder umgewandelten Zellulosen: Hydrat-, Hydro- und Oxyzellulosen.

1. Die Pilze verhalten sich, wie die Versuche ergaben, gegen die untersuchten Zellulosetypen untereinander verschieden.

2. Eine Reihe von Humuspilzen: *Stemphylium*, *Mycogone*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, *Botrytis*, *Cladosporium II (Hormodendron)*, *Penicillium I* und *II (Macrosporium)* besitzen, entgegen vielen früheren Angaben, zweifellos das Vermögen, Stoffe vom allgemeinen Charakter der „echten Zellulosen" aufzulösen.
3. Die Auflösung der Zellulose ist außer Zweifel gestellt durch folgende Tatsachen:
   a) Bei Parallelkulturen, 1. mit Zellulose, 2. ohne Zellulose, die keine anderen (löslichen) C-Quellen enthielten, vermochten die genannten Pilze nur im ersten Falle kräftig zu wachsen.
   b) Daß nicht etwa Verunreinigungen der Zellulosen dieses Wachstum hervorgebracht haben, erwiesen die Verringerung ev. das Verschwinden der Zellulose und zwar im Verhältnis der Mycelzunahme, ferner die Korrosionsfiguren der Übergangsstadien bei teilweiser Auflösung und das völlige Verschwinden der Membranen.
4. Die Pilze bewirken die Auflösung mit Hilfe hydrolytisch spaltender Enzyme. Diese werden jedoch nicht unter allen Umständen gleichmäßig, sondern regulatorisch ausgeschieden.
5. Hydro- und Oxyzellulosen werden von denselben Pilzen gespalten, die auch die Hydratzellulosen zersetzen. Es findet also höchstwahrscheinlich die hydrolytische Trennung in den Atomgruppen statt, die in allen drei Stoffen gleich sind.
6. Zur Auflösung der echten Zellulosen war von den untersuchten Phycomyceten keiner befähigt.
7. Auch mehrere der untersuchten höheren Pilze, welche zum Teil auf faulenden Pflanzenteilen vorkommen, vermögen normalerweise die Zellulose nicht zu lösen.
8. Diese Formen lassen sich auch nicht durch mancherlei Abänderung in der Versuchsanordnung zur Sekretion von Zellulase anregen.
9. Auch bezüglich der Auflösung von Hemizellulosen verhalten sich die Pilze untereinander verschieden. Es lassen sich keine Relationen über die Ausscheidung von Zellulase

und Hemizellulasen einerseits und von Hemizellulasen untereinander aufstellen.

10. Die kutinisierten und verkorkten Membranlamellen verhielten sich in allen Versuchen gegen die untersuchten Pilze resistent. Sie dürften somit einen sehr wirksamen Schutz gegen das Eindringen von Pilzhyphen in Blätter und Stengel höherer Pflanzen darstellen.
11. Den verholzten Membranen haben zwar die untersuchten Pilze einen mehr minder großen Teil ihrer Inkrusten entzogen; der darin verbleibende Teil schützte aber die Zellulosegrundlage noch vor Auflösung durch die Zellulase.
12. Der Angriff des Lösungsmittels erfolgte bei natürlicher Zellulosestruktur nicht durch gleichmäßiges Abschmelzen oder Verquellen wie bei homogenen amorphen Substanzen. Es wurden vielmehr Membranfibrillen, welche normalerweise gar nicht oder nur undeutlich sichtbar waren, vorübergehend herausdifferenziert. Sie verfielen aber schließlich genau so der vollkommenen Auflösung, wie das sie bindende Medium, das etwas schneller gelöst wurde.

Die vorliegende Arbeit wurde vom S.-S. 1912 bis S.-S. 1914 im Pflanzenphysiologischen Institut der Universität Berlin unter der Leitung von Herrn Geh. Regierungsrat Prof. Haberlandt und Herrn Prof. Benecke ausgeführt. Letzterer hat die Anregung dazu gegeben. Ich bin meinen beiden verehrten Lehrern für das Interesse, das sie meiner Arbeit entgegenbrachten, sowie für mannigfache Unterstützung und Anregung zu aufrichtigem Danke verpflichtet. Durch meine Teilnahme am Feldzuge verzögerte sich die Veröffentlichung der Arbeit.

Erklärung der Abbildungen.

Tafel V.

Fig. 1. *a* und *b* = Stadien geringerer Korrosion der Fließpapierfaser, bewirkt durch das Wachstum von *Stemphylium*. Es entstanden an der glatten Faseroberfläche Streifungen, Gruben und Korrosionskanäle. Zweimonatliche Einwirkung, submerses Papierstück. Bei längerem Angriff wurden spindelförmige Fibrillen aus der Membran herausdifferenziert und isoliert; diese wurden dann bei weiterem Pilzwachstum vollkommen aufgelöst. *c* = *Stemphylium*-Sporen.

Fig. 2. Nach 2monatlicher Einwirkung hat *Trichoderma* eine Streifung der glatten Faseroberfläche bewirkt. An früher vorhandenen Bruchstellen der Fließpapierfaser ist die Korrosion schon weiter vorgeschritten; hier sind längere Korrosionskanäle eingefressen worden und dadurch ist teilweise schon eine Isolierung der Fibrillen erfolgt.

Fig. 3. Allmähliche Auflösung der *Linum*-Faser durch *Stemphylium*. *a* = Unverletzte Faser vor der Einwirkung der Pilzenzyme; Höhnelsche Verschiebung. *b* und *c* = verschiedene Stadien der Faserauflösung nach ca. 70tägigem Pilzwachstum. Die Fasern lassen erkennen, wie an den Verschiebungen die Auflösung am schnellsten erfolgte; während sonst die Fibrillen meist noch Bündel bilden, sind hier diese auch schon in Lösung gegangen.

Fig. 4. *Linum*-Faserauflösung durch Wachstum von *Mycogone*. Im Anfangsstadium *a* läßt sich deutlich die stärkste Korrosion an den Verschiebungsstellen erkennen. *b* = Die Zellmembran ist stark abgeschmolzen, aber noch als solche zu erkennen. Die Auflösung hat Streifung und teilweise schon einzelne Fibrillen herausdifferenziert. *c* und *d* = Vorgeschrittene Stadien der Faserauslösung.

Fig. 5. Verschiedene Stadien der Auflösung von Oxyzellulose aus Leinfaser durch *Trichoderma*. *a* = Verwendete Faser mit Bruchstellen vor dem Pilzwachstum. *b* = Abschmelzungsfiguren. *c* = Korrosionsfiguren vorgeschrittener Auflösungsstadien. *d* = Langgestreckte Fibrillenbündel.

Fig. 6. *a* = Erster Angriff der *Linum*-Oxyzellulose, bewirkt durch *Cladosporium II*. Neben den Korrosionsfiguren an den Verschiebungen ist schon eine Längsstreifung entstanden. *b* = Etwas weiter vorgeschrittene Auflösung der Faser.

Fig. 7. Vorgeschrittenes Stadium der Auflösung von Baumwollfaser durch *Stachybotrys*. In Richtung der im unverletzten Zustand vorhandenen Spiralstreifung sind durch die Pilzenzyme Membranfibrillen herausdifferenziert worden, die teilweise noch zu lockeren Bündeln vereinigt, teilweise auch schon selbst der Lösung anheimgefallen sind.

Fig. 8. Auflösung der Bastzellen von *Tilia* durch *Stemphylium*. Unverholzte Faser: *a* = bei mittlerer, *b* = bei hoher Mikroskopeinstellung. Die Membran ist glatt. *c* = Anfangsstadium der Auflösung: Die Zellulosemembran zeigt eine zarte Spiralstreifung, an den Tüpfeln sind Korrosionsfiguren entstanden. *d* = Vorgeschritteneres Stadium der Membranauflösung. Es sind spiralige Gruben und Kanäle entstanden, an den Tüpfeln ist die Auflösung besonders weit erfolgt. *e* = Korrosionsfiguren an Tüpfelstellen bei starker Vergrößerung.

Fig. 9. Von den *Clivia*-Blattschnitten sind durch die Wirkung des Pilzenzyms von *Mycogone* die genannten Membranen in Lösung gegangen und von den dicken, resistenten Kutikularschichten abgeschmolzen worden.

Fig. 10. Vollkommene Auflösung der Mittellamellen an der Grenze von Holz und Mark eines Stengels von *Impatiens* durch *Aspergillus II*. Die Verdickungsschichten der Holz- und der Markzellen sowie die Zwickel haben dem Pilzenzym widerstanden.

Fig. 11. *a* = Verdickte Zellwände des Endosperms des ruhenden Samens von *Phoenix dactylifera*. *b*, *c* = Auflösung der Verdickungsschichten von den Tüpfeln aus durch *Stemphylium*. *d* = Auch die Mittellamelle wird aufgelöst. *e* = Korrosionsfiguren an den Tüpfeln bei stärkerer Vergrößerung. *a*—*e* = Auflösung bewirkt durch *Stemphylium*. *f* = Analoge Auflösung der Hemizellulose durch *Aspergillus II*.

Fig. 12. Endosperm von *Coffea arabica*. *a* = Verdickte Zellwände des ruhenden Samens. *b* = Herauslösung der Mittellamelle durch *Penicillium III*.

Lebenslauf.

Ich, Hermann Max Franz Otto, evangelischer Konfession, wurde am 12. Juni 1889 in Berlin als Sohn des Gymnasialturnlehrers Albert Otto geboren.

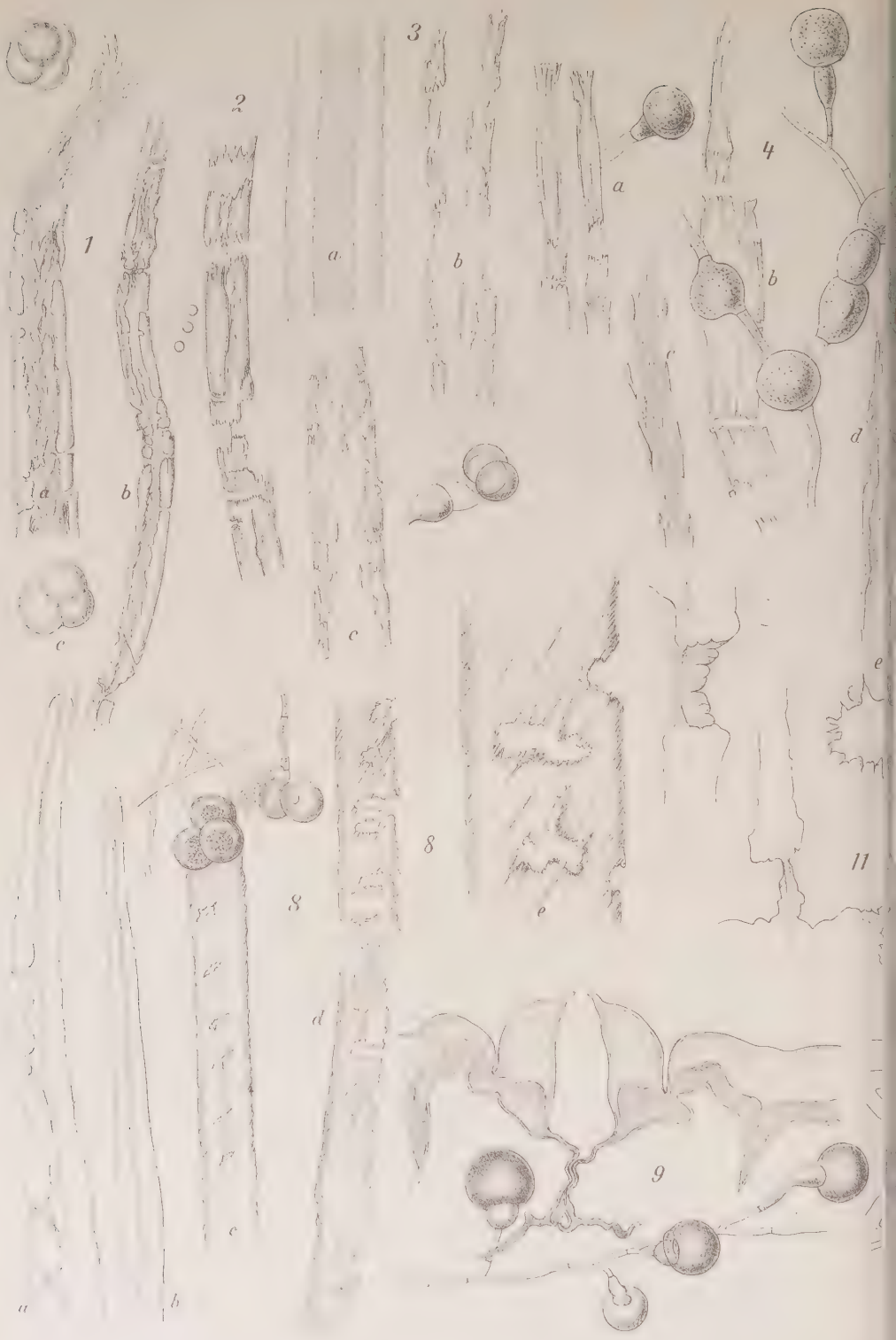
Ostern 1909 legte ich die Reifeprüfung an der Friedrichs-Werderschen Oberrealschule zu Berlin ab.

Im folgenden Sommersemester bezog ich die Friedrich-Wilhelms-Universität zu Berlin. Hier widmete ich mich vorwiegend dem Studium der Naturwissenschaften und der Mathematik.

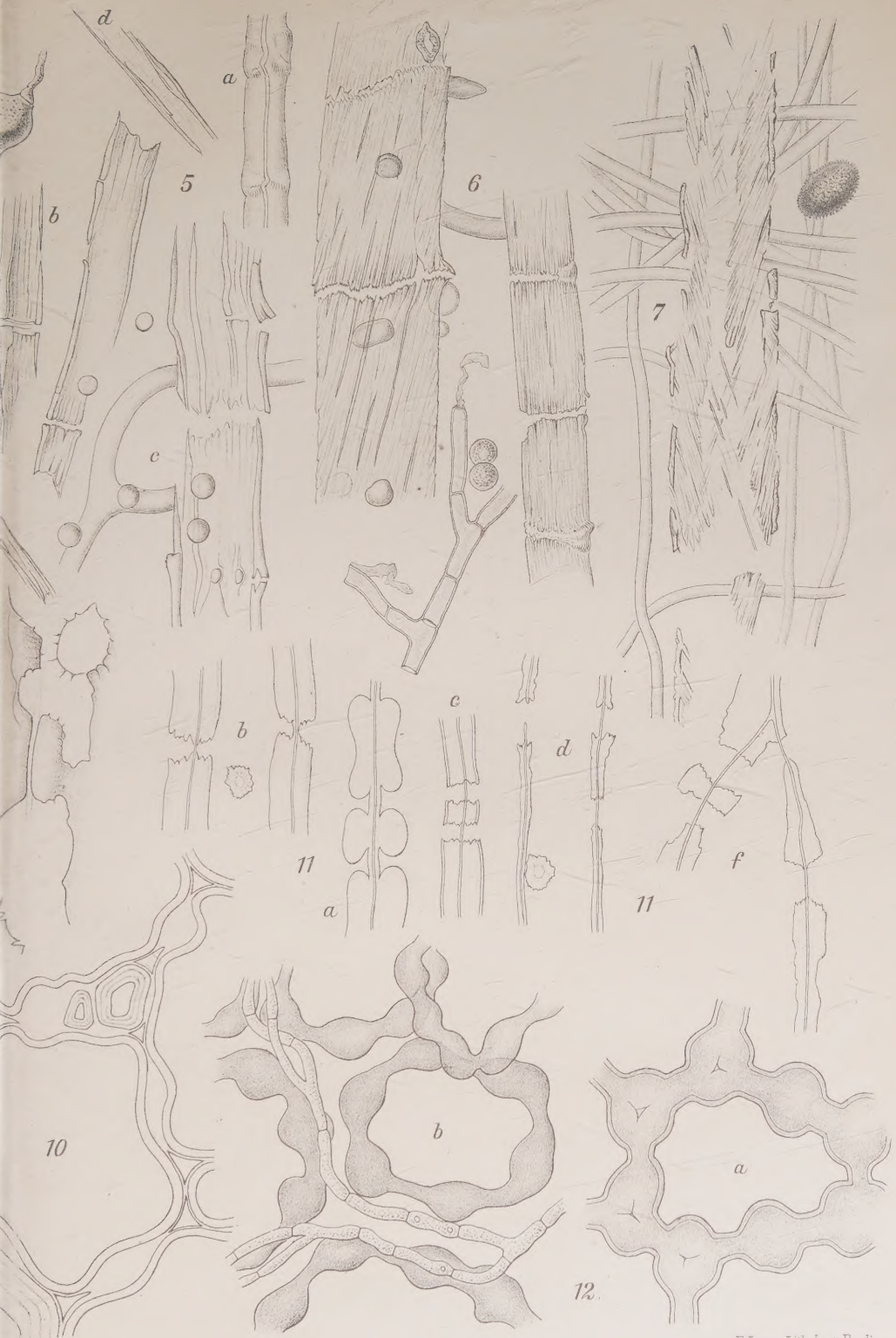
Seit dem Sommer 1912 nahm ich im Pflanzenphysiologischen Institut der Universität an den Arbeiten für Vorgeschrittene teil und brachte die vorliegende Arbeit dort im Sommer 1914 zum Abschluß. Die Promotionsprüfung legte ich am 17. September 1914 ab.

Besonderen Dank für mannigfaltige Anregungen und vielfache Unterstützungen schulde ich meinen verehrten Lehrern, vor allem den Herren

Geheimen Regierungsrat Prof. Dr. Haberlandt, Prof. Dr. Benecke, Prof. Dr. Reinhardt, Prof. Dr. v. Guttenberg und Prof. Dr. Claußen.



H. Otto gez



E. Lauc, Lith. Inst. Berlin.